

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**  
Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin  
Institut für Humangenetik

## **Molekulare Analyse *SHANK*-assoziierter Synaptopathien**

### **DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) an der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Daniel Woike  
geboren in Elmshorn

Hamburg 2022

**University Medical Center Hamburg-Eppendorf**

Center for Obstetrics and Pediatrics  
Institute for Human Genetics

**Molecular analysis of *SHANK*-associated synaptopathies**

**DISSERTATION**

with the aim of achieving a doctoral degree (Dr. rer. nat.) at the Faculty of  
Mathematics, Computer Science and Natural Science

Department of Biology at University of Hamburg

Daniel Woike  
born in Elmshorn

Hamburg 2022

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 2019 bis März 2022 in dem von Prof. Dr. Christian Kubisch geleiteten Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp absolviert. Die Doktorarbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp betreut. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in Scientific Reports veröffentlicht (Woike *et al.*, 2022).

Datum der Disputation: 19.08.2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Lohr

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	v
Zusammenfassung.....	vii
Summary .....	ix
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau und Funktion von Neuronen.....	1
1.1.1 Exzitatorische und inhibitorische Synapsen .....	1
1.1.2 Die postsynaptische Dichte .....	2
1.1.3 Synaptische Plastizität .....	2
1.2 Synaptopathien .....	3
1.2.1 Autismus-Spektrum-Störungen (ASS).....	3
1.3 Shank-Proteine .....	4
1.3.1 Shank2 .....	6
1.3.2 Shank3 .....	6
1.3.2.1 Der Shank3-N-Terminus ist ein Hotspot für ASS-assoziierte <i>missense</i> -Mutationen...	7
1.3.2.2 Struktur des Shank3-N-Terminus .....	8
1.3.2.3 Funktionen des Shank3-N-Terminus .....	8
1.3.2.4 Funktionelle Effekte von <i>SHANK3-missense</i> -Mutationen in der SPN-Ank-Region.....	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	10
2 Material & Methoden.....	11
2.1 Material .....	11
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	11
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	11
2.1.3 Medien .....	13
2.1.4 Enzyme/Proteine .....	14
2.1.5 Zellen und Gewebe.....	14
2.1.6 Antikörper.....	14
2.1.7 Kommerzielle Kits und Zubehör .....	15
2.1.8 Oligonukleotide .....	15
2.1.9 Primer .....	16
2.1.10 DNA-Plasmide.....	16
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	18
2.2.1.1 pET-SUMO-Klonierung.....	18
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.2.1.3 Transformation von BL21 <i>E. coli</i> durch Hitzeschock .....	18

2.2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> TOP10F' durch Hitzeschock.....	18
2.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA.....	19
2.2.1.6	Restriktionsverdau.....	19
2.2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese .....	19
2.2.1.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	19
2.2.1.9	Ligation .....	19
2.2.1.10	Sequenzanalyse .....	20
2.2.1.11	Mutagenese.....	20
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.2.2.1	Rekombinante Herstellung His-SUMO-markierter Proteine .....	21
2.2.2.2	Massen-Photometrie.....	22
2.2.2.3	Zellyse von HEK293T-Zellen.....	22
2.2.2.4	Immunopräzipitation mittels RFP- <i>trap</i> .....	22
2.2.2.5	Western Blot.....	22
2.2.2.6	Immuncytochemie.....	22
2.2.3	Zellbiologische Methoden .....	23
2.2.3.1	Kultivierung von HEK293T-Zellen .....	23
2.2.3.2	Transfektion von HEK293T-Zellen .....	23
2.2.3.3	Zellkultur primärer hippocampaler Neuronen .....	23
2.2.3.4	Transfektion von hippocampalen Neuronen.....	24
2.2.3.5	Präparation der postsynaptischen Dichte aus dem Gehirn adulter Mäuse .....	24
2.2.4	Mikroskopie.....	24
2.2.4.1	Konfokale Mikroskopie.....	24
2.2.4.2	STED-Mikroskopie .....	24
2.2.4.3	FRET-Lebendzellmessungen .....	25
2.2.5	Auswertung und Statistik .....	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Funktionelle Charakterisierung von <i>SHANK3-missense</i> -Mutationen.....	26
3.1.1	Eine <i>missense</i> -Mutation in den Ankyrin-Wiederholungen resultiert in einem ADHS-ähnlichen Phänotyp.....	26
3.1.2	Die Mutationen in <i>Shank3</i> beeinflussen die Bindung an Rap1a und HRas nicht .....	28
3.1.3	<i>Missense</i> -Mutationen in den Ankyrin-Wiederholungen verringern die Bindung an $\delta$ -Catenin.....	29
3.1.4	Die P141A-Mutation verstärkt die Bindung der Ankyrin-Wiederholungen an $\alpha$ -Fodrin immens.....	29
3.1.5	Die P141A-Mutation interferiert mit der intramolekularen Interaktion innerhalb des Shank3-N-Terminus.....	30

3.1.6	Der Aminosäureaustausch P141 zu A141 in den Ankyrin-Wiederholungen verstärkt die $\alpha$ -Fodrin-Interaktion spezifisch .....	31
3.1.7	Verschiedene <i>missense</i> -Mutationen führen zu einer Öffnung des SPN-Ank-Tandems...	32
3.1.8	Die <i>missense</i> -Mutationen L68P, Q106P und P141A beeinträchtigen die Bindung an die CaMKII $\alpha$ .....	34
3.1.9	Die P141A-Mutation führt zu einer verringerten Dichte postsynaptischer Shank3-Cluster.....	35
3.2	Untersuchung der Shank3-CaMKII $\alpha$ -Interaktion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	38
3.2.1	Die CaMKII $\alpha$ kompetiert in 293T-Zellen nicht mit HRas/Rap1a um Bindung an den Shank3-N-Terminus.....	38
3.2.2	Ein <i>Shank3</i> -KO resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung der CaMKII $\alpha$ .....	39
3.3	Analyse der Shank3-Clusterbildung in hippocampalen Neuronen und HEK293T-Zellen .....	40
3.3.1	Das $\Delta$ SPN-Konstrukt zeigt einen drastisch veränderten Phänotyp in hippocampalen Neuronen.....	40
3.3.2	Freie Ankyrin-Wiederholungen bilden Proteincluster in 293T-Zellen.....	43
3.3.3	Die SPN-Domäne blockiert Ank-Ank-Interaktionen .....	44
3.3.4	Die Ankyrin-Wiederholungen polymerisieren nicht in einer <i>in vitro</i> -Umgebung .....	46
3.4	Funktionelle Charakterisierung neuer <i>SHANK2</i> - <i>missense</i> Mutationen in hippocampalen Neuronen.....	47
3.4.1	<i>Missense</i> -Mutationen in <i>SHANK2</i> führen zu schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörungen .....	47
3.4.2	Erfolgreicher <i>knockdown</i> des <i>Shank2</i> -Gens in hippocampalen Neuronen .....	48
3.4.3	Die <i>SHANK2</i> - <i>missense</i> -Mutationen interferieren nicht mit der neuronalen Morphologie.....	48
3.4.4	Eine Zn <sup>2+</sup> -Langzeitbehandlung fördert das postsynaptische <i>targeting</i> von Shank2 .....	50
3.4.5	<i>SHANK2</i> - <i>missense</i> -Mutationen verändern die <i>nanoscale</i> -Organisation von PSD-95 ...	51
4	Diskussion.....	54
4.1	<i>Missense</i> -Mutationen im <i>SHANK3</i> -Gen führen über verschiedene Pathomechanismen zu neurologischen Entwicklungsstörungen .....	54
4.1.1	Die ADHS-assoziierte L270M-Mutation beeinträchtigt die Shank3- $\delta$ -Catenin-Interaktion.....	54
4.1.2	Die ASS-assoziierte P141A-Mutation interferiert massiv mit der Funktion von Shank3.....	56
4.2	Shank3 reguliert die Aktivierung der CaMKII $\alpha$ in der postsynaptischen Dichte .....	59
4.3	Störungen der SPN-Ank-Tandemfaltung beeinträchtigen die Shank3-Clusterbildung .....	64
4.4	<i>Missense</i> -Mutationen in den Schlüsseldomänen beeinträchtigen die synaptische Funktion von Shank2 auf unterschiedliche Weise .....	66
4.4.1	G643R und L1800W setzen die postsynaptische Lokalisation von Shank2 herab .....	66
4.4.2	G643R und L1800W verändern die Nanoclusterorganisation der PSD.....	69

4.5 Irreguläre Shank-Clusterbildung als mögliche Grundlage verschiedener Synaptopathien...	72
Literaturverzeichnis .....	73
Anhang .....	89
Danksagung .....	91
Lebenslauf .....	92
Eidesstattliche Versicherung .....	94

## Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung
AMPAR	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure Rezeptor
Ank	<i>Ankyrin repeats</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
As.	Aminosäure
ASS	Autismus-Spektrum-Störung
Bp	Basenpaare
CaMKII $\alpha$	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II $\alpha$
C-terminal	Carboxy-terminal
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dendr.	Dendritisch
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid 5'-Triphosphat
DSF	Differenzielle <i>scanning</i> -Fluorimetrie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
eGFP	<i>(Enhanced) Green Fluorescence Protein</i>
FCS	Fetales Kälberserum
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GKAP	<i>Guanylate-Kinase Associated Protein</i>
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEK293T	<i>Human embryonic kidney cells with large T-antigen</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
ICC	Immuncytochemie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LTD	Langzeitdepression ( <i>long term depression</i> )
LTP	Langzeitpotenzierung ( <i>long term potentiation</i> )
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mEPSC	<i>Miniature excitatory postsynaptic current</i>
mRFP	<i>Monomeric Red Fluorescent Protein</i>

ns	Nicht signifikant
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localisation signal</i> )
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> )
NT	N-Terminus
N-terminal	Aminoterminal
ODD	Oppositionelle Verhaltensstörung ( <i>oppositional defiant disorder</i> )
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA
PDZ	PSD-95/DLG/ZO1
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluorid
Proline-rich	<i>Proline-rich region</i>
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	<i>Postsynaptic density protein of 95 kDa</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>Sterile Alpha Motif</i>
SAPAP	<i>SAP90/PSD-95-Associated Protein</i>
SH3	<i>Src Homology 3</i>
Shank	<i>SH3 and multiple ankyrin repeats</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SOC	<i>Super optimal broth</i>
SPN	Shank/ProSAP N-terminal
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-Related Modifier</i>
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TB	<i>Terrific broth</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline-Tween20</i>
TEMED	N,N',N',N'-Tetra-Methyl-Ethylene-Diamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
vGlut	<i>Vesicular Glutamate Transporter</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

## Zusammenfassung

Neurologische Erkrankungen, die auf eine synaptische Fehlfunktion zurückzuführen sind, werden als Synaptopathien bezeichnet. Dazu zählen neurologische Entwicklungsstörungen wie Autismus-Spektrum-Störungen, Schizophrenie oder Epilepsie. Die Mitglieder der Shank-Proteinfamilie (Shank1-3) gehören zu den wichtigsten Gerüstproteinen der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen. Mutationen in den *SHANK*-Genen sind dabei häufig mit Autismus-Spektrum-Störungen (ASS), Schizophrenie oder geistiger Behinderung assoziiert. Der heterozygote Verlust von *SHANK3* verursacht das Phelan-McDermid-Syndrom, welches mit einer starken geistigen Behinderung und Autismus einhergeht. Interessanterweise betreffen die meisten ASS-assoziierten *SHANK3*-missense-Mutationen nicht die Kerndomänen von Shank (die PDZ- sowie die SAM-Domäne), sondern den Shank3-N-Terminus. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf molekularer Ebene sind allerdings noch nicht ausreichend erforscht. Jedoch weisen die Genveränderungen bei autistischen Patienten auf eine wichtige, bisher noch nicht verstandene Rolle der N-terminalen Domänen (SPN-Domäne und Ankyrin-Wiederholungen (Ank)) von Shank3 für die Gehirnentwicklung hin.

Diese Arbeit widmet sich der Frage, wie einzelne *missense*-Mutationen in *SHANK*-Genen zu neurologischen Entwicklungsstörungen wie Autismus führen können. Hierfür wurden neun bisher unerforschte *missense*-Mutationen, die den Shank3-N-Terminus betreffen, im Hinblick auf bekannte molekulare Interaktionen mittels Ko-Immunopräzipitationsexperimenten in HEK293T-Zellen analysiert. Für diese *missense*-Mutationen konnten zwei wesentliche Effekte abgeleitet werden: (1) eine verringerte Bindung an  $\delta$ -Catenin sowie (2) Interferenz mit der Tandemfaltung des Shank3-N-Terminus durch eine Störung des intramolekularen Kontakts zwischen SPN- und Ank-Domäne. Im Falle der ASS-assoziierten Mutation P141A bedingt die Öffnung der Tandemstruktur eine Beeinträchtigung der Interaktion mit der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII $\alpha$ ) sowie eine verstärkte Bindung an  $\alpha$ -Fodrin. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse ergab zudem, dass die P141A-Mutation die Kapazität von Shank3, in hippocampalen Neuronen postsynaptische Cluster zu bilden, herabsetzt. Interessanterweise führt auch die Expression eines Shank3-Proteins ohne die SPN-Domäne in Neuronen zu einer geringeren Dichte an synaptischen Shank3-Clustern in dendritischen Dornen und zu einer erhöhten Dichte an Shank3-Clustern auf dem dendritischen Schaft. Die Analyse verschiedener N-terminaler Shank3-Varianten in HEK293T-Zellen zeigt außerdem, dass freie Ank-Domänen intermolekular interagieren und Proteincluster bilden, während die Abschirmung der Ank-Wiederholungen durch die SPN-Domäne diese Interaktionen mehrheitlich verhindert. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann ein neuer Pathomechanismus für die Entstehung von Autismus-Spektrum-Störungen abgeleitet werden: Die Freilegung der Ank-Domäne, beispielsweise durch einen mutationsbedingten Verlust der abschirmenden Wirkung der SPN-Domäne, ermöglicht intermolekulare Ank-Ank-Interaktionen, welche die Synapsenbildung beeinträchtigen.

Basierend auf meinen Interaktionsstudien besteht eine weitere Funktion der SPN-Ank-Tandemfaltung in der Bereitstellung einer Bindungsstelle für die CaMKII $\alpha$ . Die Untersuchung der Aktivierung der CaMKII $\alpha$  in der postsynaptischen Dichte von *Shank3 $\alpha\beta$ -knockout*-Mäusen beleuchtet zudem die physiologische Relevanz der Interaktion zwischen Shank3 und der CaMKII $\alpha$ : Shank3 inhibiert über den N-Terminus die Aktivierung der CaMKII $\alpha$  und kann dementsprechend als negativer Regulator der CaMKII $\alpha$ -vermittelten Signaltransduktion interpretiert werden.

Um das Verständnis der molekularen Pathomechanismen *SHANK*-assoziierter Synaptopathien auf die Kerndomänen der Gerüstproteine auszudehnen, charakterisierte ich zwei neu identifizierte *SHANK2*-*missense*-Mutationen (G643R, L1800W), welche die PDZ- bzw. die SAM-Domäne betreffen. Beide Mutationen führen zu schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörungen. Die Analyse von G643R und L1800W in hippocampalen Neuronen mittels konfokaler und hochauflösender Mikroskopie zeigte, dass beide Mutationen mit dem postsynaptischen *targeting* von Shank2 sowie mit der *nanoscale*-Organisation der postsynaptischen Dichte interferieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit erstmalig mutationsbedingte Veränderungen in der Organisation der Nanocluster der postsynaptischen Dichte mit einer Störung der mentalen Gesundheit in Verbindung gebracht werden.

## Summary

Neurological disorders resulting from synaptic dysfunction are called synaptopathies. These include neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorders, schizophrenia or epilepsy. Shank protein family members (Shank1-3) are among the major scaffolding proteins of the postsynaptic density of excitatory synapses. Mutations in the *SHANK* genes are frequently associated with autism spectrum disorders (ASD), schizophrenia or intellectual disability. Heterozygous loss of *SHANK3* causes Phelan-McDermid syndrome, which is associated with severe intellectual disability and autism. Interestingly, most ASD-associated *SHANK3* missense mutations affect the Shank3 N-terminus rather than the core domains of Shank (the PDZ as well as the SAM domain). The effects of these mutations have not been adequately explored at the molecular level. The gene alterations in autistic patients indicate an important, as yet not understood, role of the N-terminal domains (SPN domain and Ankyrin repeats (Ank)) of Shank3 in brain development.

This work addresses the question of how single missense mutations in *SHANK* genes can lead to neurodevelopmental disorders such as autism. For this, nine previously unexplored missense mutations affecting the Shank3 N-terminus were analyzed in terms of known molecular interactions using co-immunoprecipitation experiments in HEK293T cells. Two major effects could be observed: (1) loss of binding to  $\delta$ -catenin and (2) interference with tandem folding of the Shank3 N-terminus by disrupting the intramolecular contact between the SPN domain and the Ank repeats. In the case of the ASD-associated mutation P141A, the opening of the tandem structure causes an impairment of the interaction with the  $\alpha$ -subunit of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII $\alpha$ ) and an enhanced binding to  $\alpha$ -Fodrin. Fluorescence microscopy also revealed that the P141A mutation decreases the capacity of Shank3 to form postsynaptic clusters in hippocampal neurons. Interestingly, expression of a Shank3 protein lacking the SPN domain also results in a lower density of synaptic Shank3 clusters in dendritic spines and in an increased density of Shank3 clusters on the dendritic shaft. Analysis of different N-terminal Shank3 variants in HEK293T cells also shows that free Ank domains interact intermolecularly and form protein clusters, whereas the blockade of Ank repeats by the SPN domain mainly prevents these interactions. Based on these results, a new pathomechanism for the development of autism spectrum disorders can be deduced: Exposure of the Ank domain, for example through a mutation-induced loss of the SPN domain's shielding effect, enables intermolecular Ank-Ank interactions that impair the role of Shank3 in synapse formation.

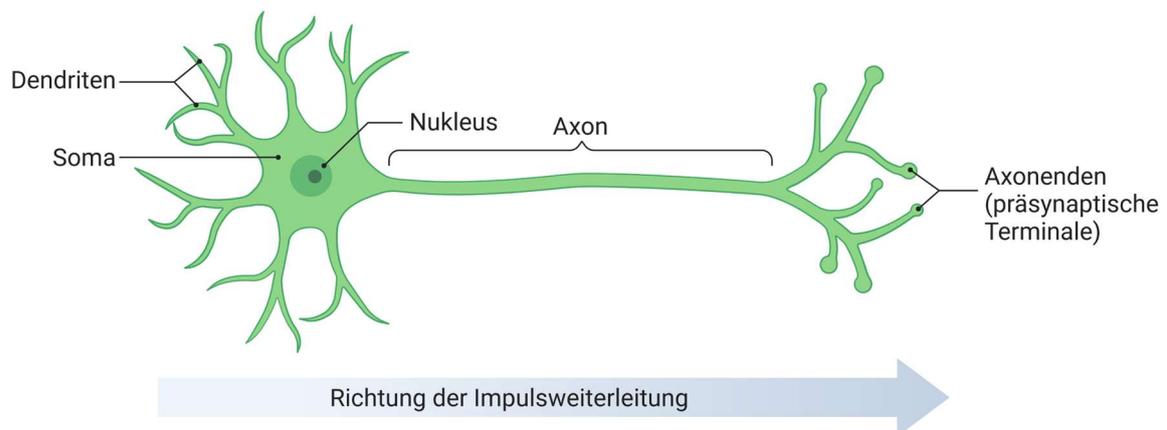
Based on my interaction studies, another function of the SPN-Ank tandem fold is to provide a binding site for the CaMKII $\alpha$ . Furthermore, the study of CaMKII $\alpha$  activation in the postsynaptic density of *Shank3* $\alpha\beta$ -knockout mice sheds light on the physiological relevance of the interaction between Shank3 and the CaMKII $\alpha$ : Shank3 inhibits CaMKII $\alpha$  activation via the N-terminus and, accordingly, can be interpreted as a negative regulator of CaMKII $\alpha$ -mediated signalling.

To extend our understanding of the molecular pathomechanisms of *SHANK*-associated synaptopathies to the core domains of the scaffold proteins, I characterized two newly identified *SHANK2* missense mutations (G643R, L1800W) affecting the PDZ and SAM domains, respectively. Both mutations lead to severe neurodevelopmental disorders. Analysis of G643R and L1800W in hippocampal neurons using confocal and high-resolution microscopy revealed that both mutations interfere with postsynaptic targeting of Shank2 as well as with nanoscale organization of the postsynaptic density. Thus, in this work, mutation-induced changes in postsynaptic density nanocluster organization could be linked to a mental disorder for the first time.

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion von Neuronen

Das Gehirn gilt als das komplexeste Organ des Menschen und besteht aus schätzungsweise 86 Milliarden Nervenzellen (Neuronen) und ähnlich vielen Gliazellen (Azevedo *et al.*, 2009; Pacitti *et al.*, 2019). Neuronen sind darauf spezialisiert, mithilfe von elektrischen und chemischen Signalen Informationen zu empfangen, zu prozessieren und weiterzuleiten (Hyman, 2005). Ein Neuron besteht typischerweise aus einem Zellkörper (dem Soma), der den Zellkern und weitere Zellorganellen enthält, und aus Zellfortsätzen (Neuriten): den Dendriten und jeweils einem Axon (Abbildung 1). Das Axon stellt den von Gliazellen umhüllten Hauptfortsatz des Neurons dar, der elektrische Reize vom Zellkörper zu den Axonenden wegleitet, während die fein verzweigten Dendriten Erregungssignale empfangen und meist in den Zellkörper weiterleiten (Chklovskii, 2004; Franze and Guck, 2010; Hyman, 2005).



**Abbildung 1: Vereinfachter Aufbau eines Neurons.** Die verästelten Dendriten empfangen Erregungssignale anderer Zellen, verarbeiten diese im Zellkörper und leiten sie über das Axon weiter. Diese Abbildung wurde mit dem Programm BioRender erstellt.

Die Kontaktstellen neuronaler Verknüpfungen, die den Informationsaustausch ermöglichen, werden als Synapsen bezeichnet (Sheng and Hoogenraad, 2007). Synapsen werden durch eine Präsynapse und eine Postsynapse geformt, die durch einen ca. 20 nm großen synaptischen Spalt voneinander getrennt vorliegen (Kasai *et al.*, 2003; Lisman *et al.*, 2007). Ein im Soma bzw. im initialen Segment des Axons erzeugtes Aktionspotenzial kann über das Axon zur Präsynapse weitergeleitet werden, wo es in ein chemisches Signal in Form von Neurotransmittern umgewandelt wird (Lisman *et al.*, 2007). Der Vesikelfreisetzende Bereich der präsynaptischen Zellmembran wird dabei als aktive Zone bezeichnet. Das chemische Signal wird über Neurotransmitterrezeptoren in der postsynaptischen Membran erkannt, sodass eine Potenzialänderung in der Postsynapse ausgelöst wird (Sheng and Hoogenraad, 2007). Die synaptische Transmission ist abhängig von spezialisierten Proteinnetzwerken in Prä- und Postsynapse, wobei bereits kleine Veränderungen der Organisation und Funktion dieser Netzwerke zu kognitiven Beeinträchtigungen führen können (Südhof, 2008).

### 1.1.1 Exzitatorische und inhibitorische Synapsen

Neuronale Synapsen können im Wesentlichen exzitatorisch (erregend) oder inhibitorisch (hemmend) wirken. Erregende, glutamaterge Synapsen bilden in der Postsynapse nach der präsynaptischen Vesikelfreisetzungs ein exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP) aus, das über eine Depolarisation der Membran die Auslösung eines neuronalen Aktionspotenzials begünstigt (Sheng and Hoogenraad, 2007). Glutamat, der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, aktiviert dabei ionotrope Glutamatrezeptoren wie NMDA-Rezeptoren oder AMPA-

Rezeptoren sowie metabotrope Glutamatrezeptoren der mGluR-Familie (Kim *et al.*, 2015; Sheng and Kim, 2011). Inhibitorische Synapsen bilden hingegen nach Stimulation durch Glycin oder GABA ein inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP) aus, das über eine Hyperpolarisation der Membran der Bildung eines Aktionspotenzials entgegenwirkt (Coombs *et al.*, 1955; Ito, 2016). Während inhibitorische Synapsen mehrheitlich entlang des dendritischen Schafts ausgebildet werden, befinden sich exzitatorische Synapsen in der Regel in aktinreichen dornenartigen Membranfortsätzen (den dendritischen Dornen, *spines*), die ein komplexes Netzwerk aus glutamatergen Rezeptoren und weiteren postsynaptischen Proteinen beinhalten (Van Spronsen and Hoogenraad, 2010).

### **1.1.2 Die postsynaptische Dichte**

Die postsynaptische Dichte (PSD) ist ein submembranöses Kompartiment unterhalb der postsynaptischen Membran dendritischer Dornen, welches sich aus einem Netzwerk aus mehr als 1100 verschiedenen Proteinen zusammensetzt (Coba *et al.*, 2009; Reim *et al.*, 2016). Zu diesen Proteinen zählen unter anderem Membranrezeptoren, Zelladhäsionsproteine, Gerüstproteine, Signalproteine sowie Komponenten des Zytoskeletts (Boeckers *et al.*, 2002; Kennedy, 2000; Nimchinsky *et al.*, 2002). Die reguläre Ausbildung der PSD ermöglicht durch die Ausrichtung der Neurotransmitterrezeptoren entgegengesetzt zur Vesikel-freisetzenden aktiven Zone die erfolgreiche synaptische Transmission (Van Spronsen and Hoogenraad, 2010). Die Untersuchung der molekularen Architektur der postsynaptischen Dichte mithilfe von hochauflösenden Mikroskopietechniken deutet darauf hin, dass die postsynaptischen Proteine sich innerhalb der PSD dabei in Nanoclusterstrukturen organisieren (Broadhead *et al.*, 2016; MacGillavry *et al.*, 2013; Nair *et al.*, 2013; Ramsey *et al.*, 2021).

### **1.1.3 Synaptische Plastizität**

Neuronale Verknüpfungen können langanhaltende Veränderungen im Hinblick auf die Intensität synaptischer Signale durchlaufen. Die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung wird dabei als synaptische Plastizität bezeichnet und stellt die zelluläre Grundlage für Lernprozesse und Gedächtnisbildung dar (Magee and Grienberger, 2020; Ramirez and Arbuckle, 2016; Ramiro-Cortés *et al.*, 2014). Wird die synaptische Übertragung verstärkt, spricht man von Langzeitpotenzierung (LTP), während eine andauernde Abschwächung der Signalübertragung an Synapsen Langzeitdepression (LTD) genannt wird (Bear and Malenka, 1994; Diering and Hugarir, 2018). Im Zuge der Langzeitpotenzierung kommt es zum Einbau von zusätzlichen AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran und zu einer generellen Vergrößerung der dendritischen Dornen (Derkach *et al.*, 2007; Diering and Hugarir, 2018; Park, 2018), während die niedrige Stimulationsfrequenz während der Langzeitdepression mit einer Schrumpfung oder sogar mit dem Verlust von Synapsen einhergeht (Oh *et al.*, 2013; Shinoda *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2004). Die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Strömen unterliegt einer strikten Regulierung (Sohal and Rubenstein, 2019). Störungen dieser Balance, beispielsweise durch Änderungen in der Anzahl oder Größe exzitatorischer oder inhibitorischer Synapsen, können mit verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht werden (Bourne and Harris, 2011; Bruining *et al.*, 2020; Calvin and Redish, 2021).

## 1.2 Synaptopathien

Eine einwandfreie synaptische Kommunikation ist eine Grundvoraussetzung für die Normalfunktion des menschlichen Gehirns. Bereits kleine Störungen der synaptischen Homöostase können zu neurologischen Erkrankungen führen. Erkrankungen, die auf eine synaptische Fehlfunktion zurückzuführen sind, werden als Synaptopathien bezeichnet (Lepeta *et al.*, 2016). Zu diesen Synaptopathien können neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz oder die Parkinson-Krankheit gezählt werden, aber auch neurologische Entwicklungsstörungen wie Epilepsie, Schizophrenie oder Autismus-Spektrum-Störungen können diesem Krankheitsbegriff untergeordnet werden (A. Grabrucker *et al.*, 2011; Grant, 2012; Lepeta *et al.*, 2016).

### 1.2.1 Autismus-Spektrum-Störungen (ASS)

Autismus-Spektrum-Störungen umfassen eine heterogene Gruppe neurologischer Entwicklungsstörungen, die durch Defizite in der sozialen Interaktion, Schwierigkeiten bei der Kommunikation und repetitive, begrenzte Verhaltensmuster charakterisiert werden können (Frye, 2018; Peper *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2020). Die autistische Störung, das Asperger-Syndrom sowie die *pervasive developmental Disorder – not otherwise specified* (PDD-NOS) stellen die am besten untersuchten ASS-Subgruppen dar (Willemsen-Swinkels and Buitelaar, 2002). Etwa 1% der Weltbevölkerung ist von einer Autismus-Spektrum-Störung betroffen, dabei erkranken Männer viermal häufiger als Frauen (Durand *et al.*, 2012; Newschaffer *et al.*, 2007).

Autismus manifestiert sich häufig bereits vor dem dritten Lebensjahr und begleitet Betroffene in der Regel ein Leben lang (Landa, 2008). In den ersten Lebensjahren werden die synaptischen Kontakte zwischen Neuronen etabliert, gestärkt und remodelliert (Tierney and Nelson, 2009). Die Ausbildung und Reifung der Synapsen ist ein hochgradig regulierter Prozess, der auf einer Balance von exzitatorischen und inhibitorischen Signalen aufbaut. Bereits mehrfach wurde die Hypothese formuliert, dass Störungen dieser Balance die Ursache für Autismus darstellen (Nelson and Valakh, 2015; Rubenstein and Merzenich, 2003; Trakoshis *et al.*, 2020). Eine eingeschränkte Hemmung der synaptischen Erregung in Cortex und Hippocampus könnte somit zu einer ineffizienten Informationsverarbeitung führen, die die Grundlage für Autismus-Spektrum-Störungen bildet (Sohal and Rubenstein, 2019).

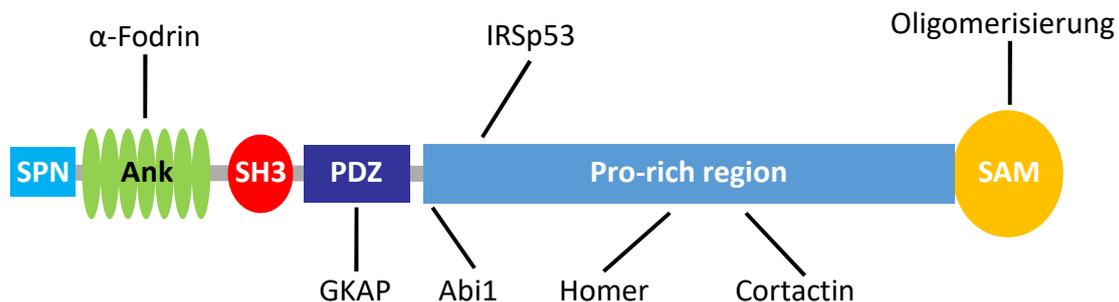
In bis zu 25% der ASS-Fälle kann eine genetische Ursache festgestellt werden. Chromosomale Umlagerungen, seltene Kopienzahlvarianten vererbte/sowie *de novo*-Mutationen in codierenden Abschnitten konnten hierbei bereits identifiziert werden (Huguet *et al.*, 2013). Allerdings ist in den meisten Fällen unklar, wie der jeweilige genetische Defekt auf molekularer Ebene zu dem assoziierten Krankheitsbild führt. Eine zentrale Aufgabe der Autismus-Forschung besteht somit darin, die molekularen Pathomechanismen, die den jeweiligen Phänotypen zugrunde liegen, aufzudecken, sodass potenzielle Therapieansätze abgeleitet werden können.

Ein wesentlicher Teil der ASS-assoziierten Gene codiert für Proteine, die an der Bildung, Entwicklung und Funktion von Synapsen beteiligt sind, sodass Autismus-Spektrum-Störungen als Synaptopathien eingestuft werden können (Arons *et al.*, 2012; Bourgeron, 2009; Grant, 2012; Lin *et al.*, 2016). Zu diesen synaptischen Proteinen gehören Membranrezeptoren (GABA- und Glutamatrezeptoren (Chen *et al.*, 2014)), Zelladhäsionsproteine (Neurexin oder Neuroligin (Jamain *et al.*, 2003; H. G. Kim *et al.*, 2008)), Signalproteine (unter anderem Regulatoren kleiner G-Proteine wie SynGAP (Clement *et al.*, 2012)) oder Gerüstproteine exzitatorischer, glutamaterger Synapsen (Shank-Proteine (Durand *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2008)).

### 1.3 Shank-Proteine

Shank-Proteine (*SH3 and multiple Ankyrin repeats proteins*) gehören zu den wichtigsten Gerüstproteinen der postsynaptischen Dichte exzitatorischer, glutamaterger Synapsen. Die Shank-Proteinfamilie umfasst die drei Proteine Shank1-3, die aus ungefähr 2000 Aminosäuren bestehen und eine Sequenzidentität von 63-87% auf Aminosäureebene aufweisen (Sheng and Kim, 2000). In adulten Nagetieren werden *Shank1-3* in Cortex, Hippocampus und Thalamus exprimiert. Darüber hinaus wird die *Shank1*-mRNA in der Amygdala und die *Shank3*-mRNA im Striatum gebildet (Böckers *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2015; Monteiro and Feng, 2017; Zitzer *et al.*, 1999). Während sich die Expression von *Shank1* ausschließlich auf das Gehirn beschränkt, werden *Shank2* und *Shank3* zusätzlich in Leber und Niere bzw. in Herz und Milz exprimiert (Lim *et al.*, 1999). Wan *et al.* zeigten zudem kürzlich, dass *SHANK3* auch im humanen Gehirn verstärkt in Cortex, Hippocampus, Striatum und Thalamus exprimiert wird (Wan *et al.*, 2021). Die Funktion von Shank2 und Shank3 in nicht-neuronalem Gewebe ist weitestgehend unbekannt, wobei vermutet wird, dass diese Gerüstproteine an der Ausbildung von Zellkontakten beteiligt sein könnten (Lim *et al.*, 1999).

Die Mitglieder der Shank-Familie verfügen über ein charakteristisches Set von Proteininteraktionsdomänen, zu denen die SPN-Domäne (Shank/ProSAP N-terminale Domäne), die Ankyrin-Wiederholungen (*Ankyrin repeats*), eine SH3-Domäne (Src-Homologie-3-Domäne), eine PDZ-Domäne (PSD-95/DLG/ZO1-Domäne), eine Prolin-reiche Region (PRR) und eine C-terminale SAM-Domäne (*Sterile Alpha Motif*) zählen (Abbildung 2) (Mameza *et al.*, 2013; Sheng and Kim, 2000).



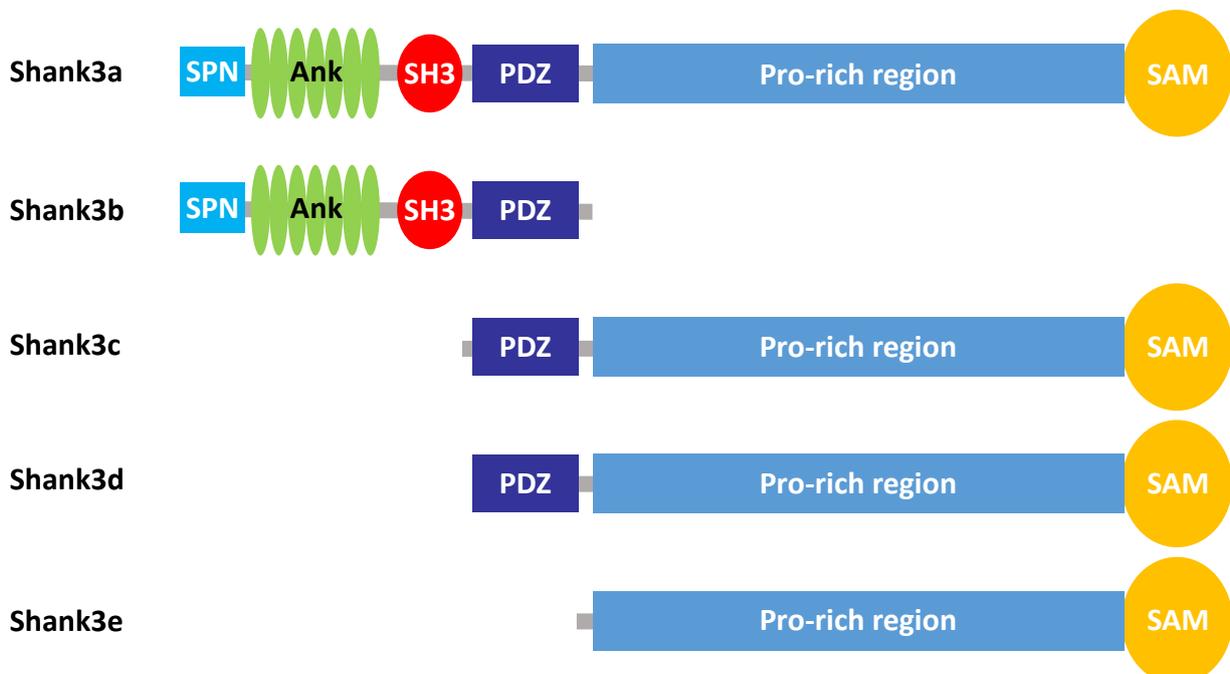
**Abbildung 2: Domänenstruktur der Shank-Proteine.** Bindungsstellen ausgewählter Interaktionspartner wurden eingezeichnet.

Über zahlreiche Proteininteraktionen verbinden Shank-Proteine indirekt Glutamatrezeptoren mit dem F-Aktin-Zytoskelett dendritischer Dornen (Kreienkamp, 2008). Entscheidend hierbei ist unter anderem die Bindung der zentralen PDZ-Domäne an das postsynaptische Gerüstprotein GKAP, sodass Shank-Proteine Teil des NMDAR/PSD-95/GKAP-Rezeptor-Komplexes werden (Boeckers *et al.*, 1999; Naisbitt *et al.*, 1999). Des Weiteren vermittelt die Homer-Bindung über die Prolin-reiche Region eine indirekte Shank-Interaktion mit metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) (Tu *et al.*, 1999). Mithilfe der Ankyrin-Wiederholungen (Bindung an  $\alpha$ -Fodrin) und der Prolin-reichen Region (Bindung an Abi1, IRSp53 und Cortactin) interagieren die Shank-Proteine zudem mit Aktin-regulierenden Proteinen (Böckers *et al.*, 2001; Du *et al.*, 1998; Proepper *et al.*, 2007; Soltau *et al.*, 2002). Die SAM-Domäne gilt als wesentlich für das synaptische *targeting* von Shank2 und Shank3 (Baron *et al.*, 2006; Boeckers *et al.*, 2005), während die postsynaptische Lokalisation von Shank1 von der PDZ-Domäne und der Ausbildung des PSD-95/GKAP/Shank-Komplexes abzuhängen scheint (Romorini *et al.*, 2004; Sala *et al.*, 2001). Die Shank-Proteine können über die C-terminale SAM-Domäne multimerisieren und dabei sowohl Homo- als auch Heterooligomere bilden (Sheng and Kim, 2000). Dabei ist die Multimerisierung von Shank2 und Shank3, im Gegensatz zu Shank1,  $Zn^{2+}$ -abhängig (Grabrucker *et al.*, 2014). Im Zuge dieser Multimerisierung werden SAM-Domänen zu einer helikalen Faser aneinandergereiht, die

wiederum interhelikale Kontakte zu weiteren SAM-Domänen ausbilden kann, sodass Shank-assoziierte Proteinkomplexe quervernetzt werden können. Es wird vermutet, dass Shank-Proteine auf diese Weise ein multivalentes Gerüst errichten, auf dem die postsynaptische Dichte aufbaut (Baron *et al.*, 2006; Grabrucker *et al.*, 2011).

Die drei *SHANK*-Gene führen aufgrund von alternativem Spleißen und intragenen Promotoren zu verschiedenen Shank-Isoformen (Lim *et al.*, 1999). *SHANK1* verfügt über zwei Promotoren, *SHANK2* über drei Promotoren und das *SHANK3*-Gen enthält insgesamt sechs Promotoren (Jiang and Ehlers, 2013). Für das *Shank3*-Gen der Maus wurde gezeigt, dass eine komplexe Transkriptionsregulation im Gehirn zu verschiedenen Shank3-Isoformen führt, die in Abhängigkeit vom Zelltyp und vom Entwicklungsstand exprimiert werden (Abbildung 3). Diese Isoformen unterscheiden sich in der subzellulären Verteilung sowie in ihren Effekten auf die Morphologie dendritischer Dornen (Wang *et al.*, 2014). Für Shank2 konnten drei Hauptisoformen identifiziert werden. Die Isoformen 3A (beginnt N-terminal mit der SH3-Domäne) und 3B (beginnt N-terminal mit der PDZ-Domäne) werden in der Ratte ausschließlich im Gehirn exprimiert (Lim *et al.*, 1999). Die Isoform Shank2E beinhaltet zusätzlich auch die SPN-Ank-Region und wird dagegen vorwiegend in epitheliale Gewebe gebildet (Williams *et al.*, 2004). Shank2E weist im Gegensatz zu den langen Isoformen von Shank1 und Shank3 keine Expression im Vorderhirn der Ratte auf (Lim *et al.*, 1999), wird aber im Cerebellum exprimiert (Leblond *et al.*, 2012).

Die komplexe Multidomänenstruktur sowie die Diversität der Shank-Isoformen könnten ein Grund für das breite Spektrum der mit Shank-Varianten assoziierten neurologischen Entwicklungsstörungen sein (Eltokhi *et al.*, 2018). *SHANK*-Mutationen können verschiedenste Proteinprodukte hervorrufen, die im Hinblick auf die spezifische Domänenstruktur vom WT-Protein abweichen. Für alle drei *SHANK*-Gene konnten *loss-of-function*-Mutationen (Berkel *et al.*, 2010; Chilian *et al.*, 2013; Leblond *et al.*, 2014, 2012; Pinto *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2012; Wischmeijer *et al.*, 2011) sowie *missense*-Mutationen (Berkel *et al.*, 2012; Gauthier *et al.*, 2008; Homann *et al.*, 2016; Peykov *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2022) bereits mit neurologischen Entwicklungsstörungen assoziiert werden.



**Abbildung 3: Darstellung der unterschiedlichen Domänenstrukturen der fünf Hauptisoformen von Shank3.** Da die SAM-Domäne entscheidend für das synaptische *targeting* von Shank3 zu sein scheint, wird die Shank3b-Isoform voraussichtlich nicht zu den Synapsen geleitet. Für die Erstellung dieser Abbildung wurde sich an Wang *et al.* (2014) orientiert.

### 1.3.1 Shank2

Shank2 ist das erste Mitglied der Shank-Familie, das zur postsynaptischen Dichte rekrutiert wird, während Shank1 und Shank3 später in der Entwicklung dazu stoßen (A. M. Grubucker *et al.*, 2011). Shank2 ist somit wahrscheinlich primär an der initialen Bildung der postsynaptischen Dichte beteiligt. Es wird vermutet, dass Shank2 dabei die Rekrutierung und Quervernetzung weiterer Shank-Moleküle unterstützt (A. M. Grubucker *et al.*, 2011).

Patienten mit Mutationen in *SHANK2* sind häufig von Autismus-Spektrum-Störungen, Schizophrenie, Entwicklungsverzögerungen und/oder geistigen Behinderungen betroffen (Leblond *et al.*, 2012; Yuen *et al.*, 2017). *Shank2-knockout*-Mäuse (*Shank2*-KO-Mäuse) weisen ein erhöhtes Angstverhalten auf und zeigen Hyperaktivität, repetitive Verhaltensweisen (wie sich häufig wiederholende Fellpflege) und Anomalien in vokalem und sozialem Verhalten (Schmeisser *et al.*, 2012; Won *et al.*, 2012). Berkel *et al.* konnten beobachten, dass eine ASS-assoziierte *nonsense*-Mutation (R462X) sowohl die gesamte neuronale Morphologie als auch die synaptische Transmission erheblich beeinträchtigt. Eine *missense*-Variante (T1127M, betrifft die PRR) interferiert hingegen mit der Morphologie dendritischer Dornen (Berkel *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu *SHANK1* und *SHANK3* konnten für das *SHANK2*-Gen auch *missense*-Mutationen identifiziert werden, die Aminosäuren der PDZ-Domäne (N690S, V717F) bzw. des N-terminal verlängerten Bereichs der PDZ-Domäne (S610Y) betreffen (Leblond *et al.*, 2012; Peykov *et al.*, 2015). S610Y und N690S werden mit Schizophrenie, V717F mit einer Autismus-Spektrum-Störung assoziiert. Für keine dieser Varianten wurde in der AG Kreienkamp ein deutlicher Effekt in Bezug auf die GKAP-Bindung der PDZ-Domäne beobachtet, sodass die molekularen Pathomechanismen dieser Mutationen unklar bleiben (unpublizierte Daten).

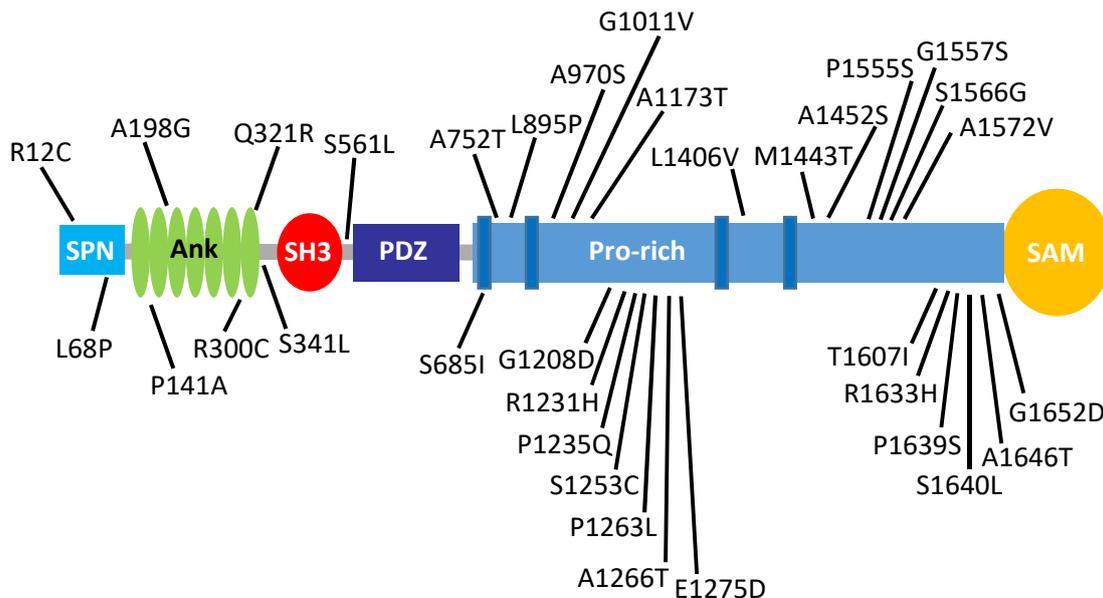
### 1.3.2 Shank3

Bereits 2007 konnte *SHANK3* als erstes *SHANK*-Gen mit Autismus-Spektrum-Störungen in Verbindung gebracht werden (Durand *et al.*, 2007; Moessner *et al.*, 2007). Der Verlust einer Kopie von *SHANK3* verursacht das Phelan-McDermid-Syndrom (auch 22q13.3-Deletionssyndrom); eine globale Entwicklungsstörung, die in der Regel mit einer starken geistigen Behinderung und Autismus einhergeht (Bonaglia *et al.*, 2011). *Shank3*-KO-Mäuse weisen Defizite im Hinblick auf soziale Interaktionen und Kommunikation auf und zeigen verstärkt repetitive Verhaltensweisen, sodass im Mausmodell ähnliche Symptome wie bei Autismus-Spektrum-Störungen festgestellt wurden (Bozdagi *et al.*, 2010; Peça *et al.*, 2011; Tatavarty *et al.*, 2020). Darüber hinaus zieht auch die *SHANK3*-Duplikation in Patienten sowie die Überexpression von *Shank3* in Mäusen jeweils eine schwere neuropsychiatrische Entwicklungsstörung nach sich (Han *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse lassen zusammengenommen den Schluss zu, dass die Shank3-Proteinmenge kritisch für die Normalfunktion des Gehirns ist. *Shank3 $\alpha\beta$* -defiziente Mäuse, denen die längeren Shank3-Isoformen (inklusive SPN-Ank-Region) fehlen, zeigten zudem eine kompensatorische Anreicherung von Shank1 und Shank2 in der postsynaptischen Dichte, während für direkte (GKAP) und indirekte (PSD-95) postsynaptische Interaktionspartner keine Veränderung im Hinblick auf die Rekrutierung zur PSD festgestellt wurde (Schmeisser *et al.*, 2012).

Für das *SHANK3*-Gen konnten in autistischen Patienten bereits eine Vielzahl an Insertionen, Deletionen, *nonsense*-, Spleiß- und *missense*-Mutationen identifiziert werden (Leblond *et al.*, 2014). Die Meta-Analyse der *SHANK3*-Mutationen von Leblond *et al.* ergab interessanterweise, dass ASS-assoziierte Mutationen besonders häufig die SPN-Domäne, die Ankyrin-Wiederholungen sowie die Prolin-reiche Region betreffen, während *SHANK3*-*missense*-Mutationen nicht in den "Kerndomänen" – PDZ- und SAM-Domäne – sowie in der SH3-Domäne auftreten. *Missense*-Mutationen in der C-terminalen Hälfte von Shank3 führen zudem nahezu ausschließlich zu Veränderungen außerhalb bekannter Interaktionsmotive innerhalb der Prolin-reichen Region (Abbildung 4), was die

Charakterisierung der funktionellen Relevanz dieser Mutationen immens erschwert. Nur in einem Fall wurde eine *SHANK3*-*missense*-Mutation identifiziert, die die Abi1-Bindungsstelle in der PRR betrifft (Wang *et al.*, 2020b).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass in ca. 1% der ASS-Fälle eine *SHANK3*-Mutation vorliegt, sodass auf eine wichtige Rolle dieses Gens für die Autismus-Pathogenese geschlossen werden kann (Awadalla *et al.*, 2010; Gauthier *et al.*, 2008; Moessner *et al.*, 2007; Waga *et al.*, 2011). Allerdings sind die molekularen Pathomechanismen dieser Mutationen in den meisten Fällen nur sehr wenig erforscht.



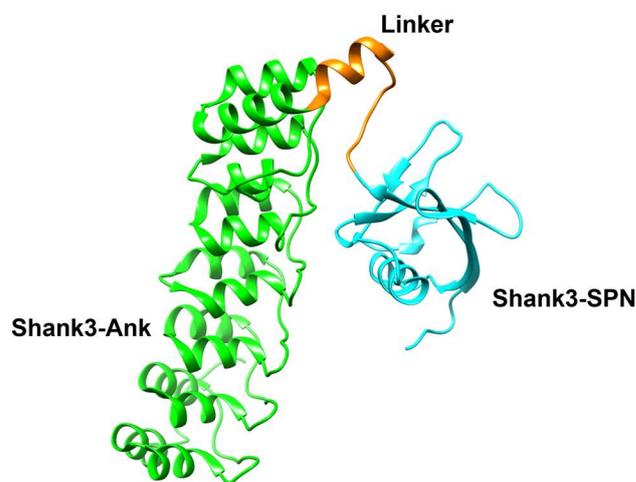
**Abbildung 4: Übersicht über die bereits identifizierten ASS-assoziierten *SHANK3*-*missense*-Mutationen.** Die blauen Rechtecke innerhalb der Prolin-reichen Region kennzeichnen die Bindungsstellen für Interaktionspartner (Abi1, IRSp53, Homer, Cortactin). Für die Erstellung dieser Abbildung wurde sich an Leblond *et al.* (2014) orientiert.

### 1.3.2.1 Der Shank3-N-Terminus ist ein Hotspot für ASS-assoziierte *missense*-Mutationen

Viele ASS-assoziierte *missense*-Mutationen betreffen den Bereich des *SHANK3*-Gens, der für die SPN-Domäne und die Ankyrin-Wiederholungen codiert, wobei die Relevanz dieser Mutationen für die Funktion von Shank3 und die Ausprägung von Autismus-Spektrum-Störungen noch nicht ausreichend bekannt ist (Hassani Nia and Kreienkamp, 2018). P141A und Q321R sind *de novo*-Mutationen (Boccutto *et al.*, 2012; Moessner *et al.*, 2007), während die weiteren *missense*-Varianten vererbt sind. A198G, R300C und S341L wurden dabei von gesunden Eltern weitergegeben; die SPN-Mutationen wurden von einer Mutter mit sozialer Phobie (R12C) und einem Vater mit Epilepsie (L68P) vererbt (Durand *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2008; Moessner *et al.*, 2007). Während *de novo*-Varianten verstärkt auf die Pathogenität der Mutationen hinweisen (Alonso-Gonzalez *et al.*, 2018), ist für die Einordnung vererbter Mutationen die Krankheitsgeschichte der betroffenen Familie interessant. Die Vererbung vererbter Mutationen die Krankheitsgeschichte der betroffenen Familie interessant. Die Vererbung der L68P-Mutation von einem Vater mit Epilepsie deutet beispielsweise darauf hin, dass diese Mutation neurologische Funktionen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren und/oder weiteren genetischen Komponenten auf unterschiedliche Weise beeinträchtigt (Hassani Nia and Kreienkamp, 2018). Die Vererbung von Mutationen gesunder Eltern lässt vermuten, dass die Varianten einen Risikofaktor für Autismus darstellen, aber nicht alleine krankheitsauslösend sind (Durand *et al.*, 2012).

### 1.3.2.2 Struktur des Shank3-N-Terminus

In Kooperation mit Igor Barsukov (Liverpool, UK) konnte in der AG Kreienkamp die 3D-Struktur der SPN-Ank-Region aufgeklärt werden (Abbildung 5) (Lilja *et al.*, 2017). Die Kristallstruktur weist auf zwei abgegrenzte Domänen hin, die über eine 19 Aminosäuren-lange Linker-Region verknüpft sind. Die ca. 230 Aminosäuren der Ank-Domäne bilden sieben Helix-turn-Helix- $\beta$ -Haarnadel Ankyrin-Strukturen aus, während die ca. 90 Aminosäuren umfassende, hochkonservierte SPN-Domäne eine Ubiquitin-ähnliche Faltung aufweist, die an die F<sub>0</sub>-Domäne des cytoskelettalen Proteins Talin erinnert. Der N-terminale Bereich der Linker-Region verläuft entlang der  $\beta$ -Haarnadel-Oberfläche der Ank-Wiederholungen und bildet polare Kontakte mit der SPN-Domäne und den Ankyrin *repeats* aus, sodass sich eine SPN-Ank-Tandemstruktur ergibt. Die strukturelle Analyse der SPN-Ank-Region bestätigt biochemische Daten, die darauf hindeuten, dass die SPN-Domäne sich in ausgiebigem intramolekularem Kontakt mit den Ank-Wiederholungen befindet, sodass eine geschlossene SPN-Ank-Konformation ausgebildet wird (Mameza *et al.*, 2013).



**Abbildung 5: Kristallstruktur des Shank3-N-Terminus (5G4X).** Sowohl die Linker-Region als auch die SPN-Domäne befinden sich in einem engen intramolekularen Kontakt zu der Ank-Domäne, sodass sich für den Shank3 N-Terminus eine Tandemfaltung ergibt.

### 1.3.2.3 Funktionen des Shank3-N-Terminus

Für die Ankyrin-Wiederholungen konnten bereits die postsynaptischen Proteine  $\alpha$ -Fodrin (ein Aktin-assoziiertes Protein) sowie  $\delta$ -Catenin als Interaktionspartner identifiziert werden (Böckers *et al.*, 2001; Hassani Nia *et al.*, 2020b). Auch Sharpin, eine Komponente eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, bindet an die Ank-Domäne von Shank3 (Lim *et al.*, 2001), allerdings ist in diesem Fall unklar, ob Sharpin zusammen mit Shank3 in der Postsynapse kolokalisiert (Hassani Nia and Kreienkamp, 2018). Während gezeigt wurde, dass die Interaktion mit dem Shank3-N-Terminus wesentlich für das postsynaptische *targeting* von  $\delta$ -Catenin ist, bleibt die Bedeutung der Ank-Fodrin-Bindung unbekannt. Es wird vermutet, dass diese Interaktion eine Verbindung zwischen Membranrezeptoren und dem Zytoskelett darstellt (Böckers *et al.*, 2001). Interessanterweise blockiert die SPN-Domäne innerhalb der geschlossenen N-terminalen Konformation die  $\alpha$ -Fodrin-Bindung (Mameza *et al.*, 2013). Eine freie SPN-Domäne scheint dagegen direkt an F-Aktin binden zu können, wobei auch in diesem Fall die Interaktion durch Ausbildung des SPN-Ank-Tandems gestört wird (Salomaa *et al.*, 2021). Bisher konnte allerdings noch kein molekularer Schalter identifiziert werden, der die Öffnung der SPN-Ank-Tandemfaltung in einem physiologischen Kontext reguliert.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen der SPN-Domäne und der F<sub>0</sub>-Region von Talin, die eine Interaktion mit dem kleinen G-Protein Rap1 vermittelt, wurde von Lilja *et al.* untersucht, ob die SPN-

Domäne an Rap- und Ras-GTPasen binden kann. Ein struktureller Vergleich der SPN-Domäne mit bekannten Ras-assoziierten Domänen deutet darauf hin, dass die Shank3-SPN-Domäne zu der Familie der Ras-assoziierten, Ubiquitin-ähnlichen Domänen gehört (Lilja *et al.*, 2017). Tatsächlich bestätigten biochemische Experimente, dass die SPN-Domäne hochaffin an die konstitutiv aktive, GTP-gebundene (G12V)-Form der G-Proteine HRas, KRas, NRas, Rap1a und Rap1b bindet. Cai *et al.* klärten zudem die Kristallstruktur der SPN-Ank-Region im Komplex mit Rap1 bzw. HRas auf (Cai *et al.*, 2020a). Während HRas ausschließlich an die „kanonische“ Ras-assoziierte Domäne innerhalb des Shank-N-Terminus – die SPN-Domäne – bindet, kann Rap1 noch mit einer zweiten Bindungsstelle interagieren, die von den C-terminalen Aminosäureresten der Ankyrin-Wiederholungen zusammen mit der SPN-Domäne gebildet wird. Vorausgegangene Experimente aus der AG Ivaska (Turku, Finnland) und der AG Kreienkamp weisen darauf hin, dass Shank3 als Negativregulator von Rap fungiert, indem Shank3 mit der SPN-Domäne aktives Rap bindet/einfängt und in der Konsequenz die Rap-vermittelte Integrinaktivierung inhibiert, sodass die Bildung von Filopodien unterdrückt wird (Lilja *et al.*, 2017). Dagegen ist die physiologische Bedeutung der Shank3-Ras-Bindung im Grunde vollkommen unklar.

Eine kürzlich erschienene Studie identifizierte darüber hinaus die inaktive, nicht-phosphorylierte Form der CaMKII $\alpha$  als einen neuen Interaktionspartner des Shank3-N-Terminus (Cai *et al.*, 2020b). Die CaMKII $\alpha$  bindet dabei vornehmlich an die *loop*-Region zwischen SPN- und Ank-Domäne, wobei die funktionelle Relevanz dieser Interaktion jedoch erst erforscht werden muss.

#### **1.3.2.4 Funktionelle Effekte von SHANK3-missense-Mutationen in der SPN-Ank-Region**

Die molekularen Effekte mehrerer ASS-assoziiertes *missense*-Mutationen wurden bereits, überwiegend mittels biochemischer Interaktionsstudien, untersucht. Während die Mutationen in den Ankyrin-Wiederholungen nur moderate Veränderungen hinsichtlich der Bindung an die bekannten Ank-Interaktionspartner  $\alpha$ -Fodrin und Sharpin verursachten (Mameza *et al.*, 2013), führten beide Mutationen der SPN-Domäne (R12C, L68P) zu einer stark beeinträchtigten Bindung an kleine G-Proteine der Ras-Familie (Lilja *et al.*, 2017). Der Aminosäurerest R12 bildet ein für die Bindung wesentliches Ionenpaar mit dem E37-Rest der Ras-Proteine aus, dessen Verlust die Bindungsaffinität der SPN-Domäne für GTP-gebundenes Ras oder Rap drastisch verringert. Dagegen scheint L68P die SPN-Domäne partiell zu entfalten, sodass nicht nur die Bindung an kleine G-Proteine, sondern auch die intramolekulare Interaktion zwischen SPN-Domäne und Ank-Wiederholungen erheblich gestört wird (Bucher *et al.*, 2021; Mameza *et al.*, 2013).

Um die Auswirkungen der N-terminalen Mutationen auf die synaptische Funktion von Shank3 zu untersuchen, wurden einige *missense*-Mutationen in primär kultivierten Neuronen analysiert. Die Expression der Varianten R12C, R300C und Q321R in hippocampalen Neuronen wirkte sich nicht wesentlich auf das synaptische *targeting* von Shank3 aus (Arons *et al.*, 2012; Durand *et al.*, 2012). Im Hinblick auf die Bildung dendritischer Dornen konnte zumindest eine leichte Verringerung im Vergleich zum WT beobachtet werden (Durand *et al.*, 2012). Darüber hinaus führte die *de novo*-Mutation Q321R zu einer reduzierten Länge dendritischer Dornen, während R12C und R300C keinen Effekt in dieser Hinsicht zeigten. Bucher *et al.* zeigten kürzlich, dass die L68P-Mutante verglichen mit dem WT verstärkt auf dem dendritischen Schaft und weniger häufig in dendritischen Dornen Cluster ausbildet (Bucher *et al.*, 2021). Ein klarer Effekt der L68P-Variante bezüglich der synaptischen Transmission konnte allerdings nicht festgestellt werden (Mameza *et al.*, 2013). Die verringerte mEPSC-Frequenz (*miniature excitatory postsynaptic current*) in *Shank3-knockdown*-Neuronen (Expression eines *shShank3*-Konstruktes) konnte durch die Transfektion mit einem L68P-Konstrukt analog zum WT wiederhergestellt werden, sodass die L68P-Mutation in Bezug auf die synaptische Übertragung nicht zu einem vollständigen Funktionsverlust zu führen scheint. Durand *et al.* beobachteten einen signifikanten Anstieg der mEPSC-Frequenz durch die Überexpression von Shank3, während die

Überexpression der *missense*-Mutationen R12C, R300C und Q321R im Verhältnis in einem geringeren Anstieg der mEPSC-Frequenz resultierte (Durand *et al.*, 2012). Darüber hinaus führten diese Mutationen im Vergleich zum WT nach jeweiliger Überexpression zu einer verringerten Amplitude von sowohl AMPAR- als auch NMDAR-vermittelten EPSCs (Arons *et al.*, 2012).

Meyer *et al.* berichteten, dass Shank3 nicht nur die Funktion postsynaptischer exzitatorischer Synapsen entscheidend beeinflusst, sondern sich auch über eine direkte Interaktion mit dem zytoplasmatischen Ende von Neuroligin auf die präsynaptische Funktion auswirkt (Meyer *et al.*, 2004). Interessanterweise waren die überexprimierten *missense*-Varianten R12C, R300C und Q321R im Gegensatz zum Shank3-WT nicht dazu imstande, die Menge an postsynaptischem Homer sowie präsynaptischem vGlut zu erhöhen (Arons *et al.*, 2012). Des Weiteren induzierte ein Anstieg in der  $Zn^{2+}$ -Konzentration eine Stabilisierung von Shank3 (WT und R12C) in der Postsynapse, während die R12C-Variante nach  $Zn^{2+}$ -Behandlung abweichend vom WT nicht in einer erhöhten präsynaptischen vGlut-Anreicherung resultierte (Arons *et al.*, 2016). Diese Daten deuten nicht nur auf eine  $Zn^{2+}$ -sensitive, voraussichtlich SAM-Domänen-abhängige Shank3-Dynamik hin, sondern implizieren, dass die R12C-Variante mit der transsynaptischen Signalgebung interferiert (Hassani Nia and Kreienkamp, 2018).

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen in den *SHANK*-Genen werden mit neurologischen Entwicklungsstörungen wie Autismus-Spektrum-Störungen, Epilepsie oder geistiger Behinderung assoziiert. Insbesondere der N-Terminus des Shank3-Proteins stellt einen Hotspot für ASS-assoziierte *missense*-Mutationen dar. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf molekularer, struktureller sowie zellbiologischer Ebene sind allerdings noch nicht ausreichend erforscht, sodass das Verständnis der Pathogenität dieser Mutationen äußerst begrenzt ist.

Mit dieser Doktorarbeit möchte ich einen wesentlichen Beitrag zur Beantwortung der Frage leisten, wie einzelne *missense*-Mutationen in *SHANK*-Genen zu neurologischen Entwicklungsstörungen wie Autismus führen können. Hierfür sollen bisher unerforschte *missense*-Mutationen, die den N-terminalen Bereich von Shank3 betreffen, auf funktioneller Ebene charakterisiert werden. Die Analyse der Auswirkungen dieser Mutationen auf bekannte molekulare Interaktionen sowie die synaptische Funktion von Shank3 soll dazu beitragen, neue Pathomechanismen neurologischer Entwicklungsstörungen zu identifizieren.

Die Genveränderungen bei Patienten deuten auf eine wichtige, bisher noch nicht verstandene Rolle der N-terminalen Domänen (SPN + Ank) von Shank3 für die Gehirnentwicklung hin. Die neuronale Relevanz der SPN-Ank-Tandemfaltung ist dabei vollkommen unklar. Im Rahmen dieser Arbeit soll näher untersucht werden, welche funktionelle Bedeutung die SPN-Ank-Tandemstruktur für die Synapsenbildung besitzt und inwiefern dieser Prozess durch bei Patienten gefundene Mutationen gestört wird.

Ein möglicher Ansatz für die Analyse der Funktion von Shank3 stellt die kürzlich publizierte Interaktion zwischen dem Shank3-N-Terminus und der inaktiven Form der CaMKII $\alpha$  dar. Ich möchte *in vivo* herausfinden, ob der Shank3-N-Terminus die Aktivierung der CaMKII $\alpha$  reguliert.

Darüber hinaus soll analysiert werden, inwiefern kürzlich identifizierte *SHANK2*-*missense*-Mutationen, die die Shank-Kerndomänen betreffen (PDZ- und SAM-Domäne), zu Defiziten in der synaptischen Funktion von Shank2 führen. Diese neuen *missense*-Mutationen interferieren mit molekularen Interaktionen von Shank2, die zentral für den Aufbau der postsynaptischen Dichte zu sein scheinen, und sollen dementsprechend mittels hochauflösender Mikroskopie im Hinblick auf mögliche Auswirkungen auf die *nanoscale*-Organisation der PSD untersucht werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen, wenn es nicht anders angegeben ist (Tabelle 1).

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer/Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
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
Fixierungspuffer	1x PBS 4% (w/v) Paraformaldehyd 4% (w/v) Saccharose
HBS (2x)	275 mM NaCl 10 mM KCl 1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15 mM Glucose 42 mM Hepes pH 7,05
Imidazol-Puffer	3 M Imidazol 500 mM NaCl 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,0
IP-Puffer	50 mM Tris-HCl 120 mM NaCl 0,5% (v/v) NP40 1 mM EDTA
KCM-Puffer (5x)	50 mM KCl 150mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM MgCl <sub>2</sub>
Lämmli-Probenpuffer (5x)	300 mM Tris-HCl, pH 6.8 50% (v/v) Glycerol 7,5% (w/v) SDS 0,5 M DTT 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Nativer Puffer (5x)	250 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 M NaCl pH 8,0
Natriumhydrogencarbonat-Puffer	0,3 M NaCl 0,1 M NaHCO <sub>3</sub>
PBS (1x)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4

Permeabilisierungspuffer für Immuncytochemie	0,1% Triton X-100 in 1x PBS
Poly-L-Lysin-Lösung	1 mg/mL Poly-L-Lysin in 100 mM Borsäure
Sammelgel	500 µL 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8 700 µL 30% Acrylamid 2,8 mL ddH <sub>2</sub> O 40 µL 10% (w/v) SDS 40 µL 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) 3 µL Tetramethylethylendiamin (TEMED)
SDS-PAGE-Laufpuffer	1x 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	1x Tris/Glycin 0,02% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
Trenngel (10%)	2,6 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 3,3 mL 30% Acrylamid 3,9 mL ddH <sub>2</sub> O 100 µL 10% (w/v) SDS 100 µL 10% (w/v) APS 7 µL TEMED
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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,32 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Lösung A zur Präparation der PSD	4 mM Hepes pH 7,4 0,32 M Saccharose 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> 2 µg/mL Pepstatin 10 µg/mL Leupeptin 44 µg/mL PMSF
Lösung B zur Präparation der PSD	4 mM Hepes pH 7,4 0,32 M Saccharose 2 µg/mL Pepstatin 10 µg/mL Leupeptin 44 µg/mL PMSF
Lösung C zur Präparation der PSD	12 mM Tris-HCl pH 8,1 0,32 M Saccharose 1% (v/v) Triton X-100 2 µg/mL Pepstatin 10 µg/mL Leupeptin 44 µg/mL PMSF

### 2.1.3 Medien

Tabelle 2: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium	DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 10% (v/v) FCS (fetales Kälberserum) (Thermo Fisher Scientific) 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific)
LB-Medium	10 mg/mL Trypton 5 mg/ml Hefeextrakt 5 mg/ml NaCl pH 7,5
LB-Agar	10 mg/ml Trypton 5 mg/ml Hefeextrakt 5 mg/ml NaCl 15 mg/mL Agar pH 7,5
Neuronen-Präparationsmedium	HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Thermo Fisher Scientific) 100 µg/ml Penicilin/Streptomycin
Neuronen-Plattiermedium	DMEM 10% (v/v) Pferdeserum (Thermo Fisher Scientific) 1% (v/v) Glutamax (Thermo Fisher Scientific) 0,6% (v/v) Glucose 100 µg/ml Penicilin/Streptomycin
Neuronen-Kulturmedium	Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) 2% (v/v) B27 (Thermo Fisher Scientific) 1% (v/v) Glutamax 100 µg/ml Penicilin/Streptomycin
Neuronen-Transfektionsmedium	MEM (Thermo Fisher Scientific) 1% (v/v) Glutamax
SOC-Medium	20 mg/mL Trypton 5 mg/mL Hefeextrakt 0,5 mg/mL NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Glucose
TB-Medium	12 mg/mL Trypton 24 mg/mL Hefeextrakt 5 mg/mL Glycerin 10% (v/v) 10x TB-Salzpuffer
TB-Salzlösung	0,17 M KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,72 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

## 2.1.4 Enzyme/Proteine

Tabelle 3: Verwendete Enzyme/Proteine und deren Hersteller.

Enzyme	Hersteller
FastAP (alkalische Phosphatase)	Thermo Fisher Scientific
FastDigest Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Merck
Neuron Isolation Enzyme (with papain)	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA (0.5%)	Thermo Fisher Scientific
Vent® DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)

## 2.1.5 Zellen und Gewebe

Tabelle 4: Verwendete Bakterien/Zelllinien/Labortiere und deren Hersteller.

Zellen und Gewebe	Hersteller
<u>Bakterienstämme (<i>E. coli</i>)</u>	
BL21 DE3	New England Biolabs
One Shot® Mach1™-TrR	Thermo Fisher Scientific
TOP10F'	Thermo Fisher Scientific
<u>Zelllinien</u>	
HEK293T	ATCC, Manassas, USA
<u>Primäre Zellen</u>	
Hippocampale Neuronen	<i>Rattus norvegicus</i> , Wistar-Stamm (Envigo, Indianapolis, USA)
<u>Gewebe</u>	
Mausgehirne adulter Mäuse für PSD-Präparation	<i>Shank3αβ</i> -defiziente Mäuse (T.Böckers, Ulm) sowie WT-Mäuse ( <i>Mus musculus</i> , Forschungstierhaltung, UKE)

## 2.1.6 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper und deren Hersteller.

Primäre Antikörper	Verdünnung WB	Verdünnung ICC	Hersteller
Rb anti-CaMKII	1:5000		Cell Signaling #3361S (Danvers, USA)
Rb anti-phospho-CaMKII	1:1000		Cell Signaling #3361
Ms anti-GFP	1:3000		Covance MMS-118P (Princeton, USA)
Ms anti-HA-7	1:20.000		Merck H9658
Chk anti-MAP2		1:1000	Antibodies-Online RRID:AB_2338133 (Aachen, Deutschland)
Ms anti-PSD-95	1:2000	1:500	Thermo Fisher Scientific MA1-046
Rt anti-RFP	1:1000		ChromoTek 5F8 (Planegg- Martinsried, Deutschland)
Ms anti-T7	1:10.000		Merck 69522

Rb anti-Shank2		1:250	Merck HPA008174
Gp anti-Shank3	1:1000		Synaptic Systems 162304 (Göttingen, Deutschland)
Rb anti- $\alpha$ -Tubulin	1:1000		Santa Cruz sc-5546 (Dallas, USA)
Rb anti-vGlut		1:2000	Synaptic Systems 135303

**Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper und deren Hersteller.**

Sekundäre Antikörper	Verdünnung WB	Verdünnung ICC	Hersteller
Abberior Star RED goat anti-Ms		1:1000	Abberior (Göttingen, Deutschland)
Abberior Star RED goat anti-Rb		1:1000	Abberior
Alexa 405 goat anti- Chk IgG		1:1000	Abcam ab 175675 (Cambridge, UK)
Alexa 594 goat anti- Ms IgG		1:1000	Thermo Fisher Scientific A32742
Alexa 633 goat anti- Ms IgG		1:1000	Thermo Fisher Scientific A-21050
Alexa 633 goat anti-Rb IgG		1:1000	Thermo Fisher Scientific A-21070
Cy3 goat anti-Rb IgG		1:1000	Dianova (Hamburg, Deutschland)
HRP Gt anti-Ms IgG	1:2500		Jackson Immunoresearch 115- 035-174 (West Grove, USA)
HRP Gt anti-Rb IgG	1:2500		Jackson Immunoresearch 111- 035-144
HRP Gt anti-Rt IgG	1:2500		Jackson Immunoresearch 112- 035-062

### 2.1.7 Kommerzielle Kits und Zubehör

**Tabelle 7: Verwendete Kits und Zubehör.**

Kits und Zubehör	Hersteller
BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific
NucleoBond® Xtra Maxi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
RFP-trap® Agarose	ChromoTek

### 2.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Merck erworben und mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100  $\mu$ M eingestellt. Anschließend wurden 10  $\mu$ M Stammlösungen angesetzt, die für bspw. Mutagenese-Reaktionen oder Sequenzierungen eingesetzt wurden.

## 2.1.9 Primer

**Tabelle 8: Verwendete Sequenzierungsprimer und deren Sequenz.**

Sequenzierungsprimer	Sequenz (5' - 3')
GFP1 fwd	AGTTCATGACCGCCGCCGGGA
GFP-n-fwd	AATGTCGTAACAACCTC
pcDNA fwd	GGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
pcDNA rev	GGCTGGCAACTAGAAGGC
pmRFP rev	GTCACCTTCAGCTTGGCG
SVPA2 rev	ATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG

**Tabelle 9: Für die Mutagenese verwendete Primer.**

Mutagenese-Primer	Sequenz
D69Gfor	CGCGCCGGCAAGTTCCTGGGTGAAGAGCGGCTCTTACAG
D69Grev	CTGTAAGAGCCGCTCTTCACCCAGGAACCTTGCCGGCGCG
Q106Pfor	GAACCTCATAGATGACAAGCCGTTTGCAAAGCTGCACACAAAG
Q106Prev	CTTTGTGTGCAGCTTTGCAAACGGCTTGCATCTATGAGGTTCC
P141Afor	GACAAGGGGCTGGACGCCAATTTCCATGACCCTGAC
P141Arev	GTCAGGGTCATGGAAATTGGCGTCCAGCCCCTTGTC
G250Cfor	GGGACCACTGACGAGAATTGCTGGCAGGAGATCCATCAG
G250Crev	CTGATGGATCTCCTGCCAGCAATTCTCGTCAGTGGTCCC
Q256Hfor	GGCTGGCAGGAGATCCATCATGCCTGTCTCGCTTTGGGCATG
Q256Hrev	CATGCCCAAAGCGACAGGCATGATGGATCTCCTGCCAGCC
L270Mfor	CAGCACTTGGAGCACCTGATGTTCTATGGGGCCAACATG
L270Mrev	CATGTTGGCCCCATAGAACATCAGGTGCTCCAAGTGCTG
Y272Cfor	CTTGGAGCACCTGCTGTTCTGTGGGGCCAACATGGGTGCC
Y272Crev	GGCACCCATGTTGGCCCCACAGAACAGCAGGTGCTCCAAG
Q317Rfor	GTCCGCAATTACAACAGCCGGACAGCCTTCCAGGTGGCC
Q317Rrev	GGCCACCTGGAAGGCTGTCCGGCTGTTGTAATTGCGGAC
T337for	CTTGCCGAGGTAATCAAGTCCCACAAAGAATTCTGCAGTCG
T337rev	CGACTGCAGAATTCTTTGTGGGACTTGATTACCTCGGCAAG

## 2.1.10 DNA-Plasmide

Es wurden Plasmide aus dem Bestand der AG Kreienkamp verwendet (UKE, Hamburg); weitere Plasmidvektoren wurden im Zuge dieser Arbeit generiert (Tabelle 10). Für Shank3-Konstrukte wurde die Sequenz der Ratte verwendet; für Shank2 wurde die humane Sequenz eingesetzt.

**Tabelle 10: Verwendete Plasmide.**

Plasmid	Resistenz	Ursprung
HA-HRas G12V (humane Sequenz)	Ampicillin	AG Rosenberger (UKE, Hamburg, Deutschland)
HA-Rap1a (humane Sequenz)	Ampicillin	AG Rosenberger
pcDNA3	Ampicillin	Thermo Fisher Scientific
pEGFP C1	Kanamycin	Clontech (Mountain View, USA)
pEGFP- $\delta$ -Catenin (Sequenz aus der Maus)	Kanamycin	Kenneth Kosik (Santa Barbara, USA)
pEGFP-Fodrin (Sequenz aus der Ratte)	Kanamycin	Tobias Böckers (Ulm, Deutschland)

pEGFP-Rap1a G12V (humane Sequenz)	Kanamycin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank2 WT	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank2 G643R	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank2 L1800W	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank3 WT	Ampicillin	Alex Shcheglovitov (Salt Lake City, USA)
pEGFP pHAGE-Shank3 N52R	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank3 Q106P	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank3 P141A	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank3 L270M	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank3 $\Delta$ NT ( $\Delta$ SPN + Ank)	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP pHAGE-Shank3 $\Delta$ SPN	Ampicillin	AG Kreienkamp
pEGFP Shank3 WT As. 75-339	Ampicillin	AG Kreienkamp
pFRET	Kanamycin	AG Kreienkamp
pFRET-Shank3 WT As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pFRET-Shank3 N52R As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pFRET-Shank3 L68P As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pFRET-Shank3 P141A As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP N2	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 WT As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 N52R As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 L68P As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 D69G As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Q106P As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 P141A As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 G250C As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Q256H As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 L270M As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Y272C As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Q317R As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 T337S As. 1-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 WT As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Q106P As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 P141A As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 G250C As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Q256H As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 L270M As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Y272C As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 Q317R As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
pmRFP Shank3 T337S As. 75-339	Kanamycin	AG Kreienkamp
T7-CaMKII $\alpha$ (humane Sequenz)	Ampicillin	AG Kreienkamp

**Tabelle 11: Verwendete shRNA-Vektoren.**

Vektor	Resistenz	Ursprung
pSuper Shank2 shRNA	Ampicillin	AG Kreienkamp

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 pET-SUMO-Klonierung

Die Generierung von pET-SUMO-Konstrukten erfolgte mittels Champion™ pET SUMO Expression System nach den Herstellerangaben von Invitrogen (Waltham, USA). Zur Vervielfältigung der DNA wurden One Shot® Mach1™-Tr<sup>R</sup>-Bakterien verwendet. Die Hitzeschock-Transformation dieser Bakterien erfolgte nach den Herstellerangaben.

#### 2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die PCR-Methode unter Einsatz der Vent® Polymerase angewandt. Dafür wurde ein PCR-Ansatz gemäß Tabelle 12 angesetzt.

Tabelle 12: Zusammensetzung PCR-Ansatz.

Komponente	Volumen (µL)
ThermoPol Reaction Buffer (10x)	5
dNTP Mix (10 mM)	2
<i>forward</i> Primer (10 µM)	3
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	3
Plasmid-DNA (100 ng/µL)	1
Vent® DNA Polymerase	0,5
ddH <sub>2</sub> O	35,5

Die PCR wurde im Thermocycler anhand des in Tabelle 13 beschriebenen Temperaturprogramms durchgeführt.

Tabelle 13: Temperaturprogramm für die PCR.

Prozess	Temperatur (°)	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3 min	1
Amplifikation	95	30 s	30
	65	30 s	
	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	5 min	1
Lagerung	4	∞	1

#### 2.2.1.3 Transformation von BL21 *E. coli* durch Hitzeschock

40 µL BL21 *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 20 s bei 42 °C wurden die Bakterien 2 min auf Eis inkubiert. 250 µL des bei 37 °C vorgewärmten SOC-Mediums wurde hinzugegeben und die Bakterien wurden für 1 h bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten mit selektivem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.1.4 Transformation von *E. coli* TOP10F' durch Hitzeschock

100 µL *E. coli*-Bakterien des TOP10F'-Stammes wurden auf Eis aufgetaut, mit 79 µL ddH<sub>2</sub>O, 20 µL 5x KCM-Puffer und 1 µg Plasmid-DNA (1 µL) vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 5 min bei 37 °C wurde zu den Bakterien 1 mL Antibiotika-freies LB-Medium pipettiert und der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien

pelletiert (13.300 rpm, 1 min) und in 60 µL LB-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten mit selektivem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### **2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA**

##### **2.2.1.5.1 Minipräparation**

3 mL LB-Medium mit selektivem Antibiotikum wurde mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 1,5 mL dieser Kultur wurden bei 13.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL Resuspensionspuffer mit RNase resuspendiert, mit 100 µL Lysispuffer versetzt und für 2 min RT inkubiert. Durch Zugabe von 100 µL Neutralisationspuffer wurde die Zellyse beendet. Die verwendeten Puffer stammten aus dem NucleoBond Midiprepkit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Nach einem Zentrifugationsschritt (13.300 rpm, RT, 20 min) wurde der Überstand abgenommen, mit 210 µL Isopropanol gemischt und bei 13.300 rpm, RT und 20 min gefällt. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µL 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen (13.300 rpm, RT, 5 min). Anschließend wurde das DNA-Pellet bei RT getrocknet und in 100 µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

##### **2.2.1.5.2 Midipräparation**

100 mL LB-Medium mit selektivem Antibiotikum wurde mit 1,5 mL einer *E. coli*-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die DNA-Isolierung wurde entsprechend der Herstellerangaben mithilfe des NucleoBond Xtra Midi Kits der Firma Macherey und Nagel durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 100 µL TE-Puffer gelöst, die Konzentration am Spektralphotometer (Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System) gemessen und auf 1 µg/µL eingestellt.

##### **2.2.1.6 Restriktionsverdau**

Für den Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA wurden FastDigest Enzyme verwendet, welche die DNA an spezifischen Sequenzen (Restriktionsstellen) schneiden. Zu 1 µg Plasmid-DNA wurden 2 µL 10x Green FD-Puffer und je 1 µL Restriktionsenzym hinzugegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µL aufgefüllt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 45 min. Um die intramolekulare Religation des Ausgangsvektors bei einer Klonierung zu verhindern, wurde 1 µL der Alkalischen Phosphatase (FastAP) dem Reaktionsansatz hinzugefügt, um freistehende 5'-Phosphatgruppen zu entfernen.

##### **2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe auf 1%igen – 1,3%igen (w/v; Agarose in TAE-Puffer) Gelen aufgetrennt. Für die Gelherstellung wurden 60 mL einer erhitzten Agarose-TAE-Lösung mit 3 µL Ethidiumbromid versetzt. Proben, die kein 10x Green FD-Puffer enthielten, mussten vor der Auftragung auf das Gel mit 6x Ladepuffer verdünnt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für 25 min; die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mittels UV-Licht.

##### **2.2.1.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Mittels Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Gelextraktion der DNA wurde mithilfe des GeneJet Gel Extraction Kits (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

##### **2.2.1.9 Ligation**

Um DNA-Fragmente (*inserts*) in einen neuen Vektor einzubringen, wurde eine Ligationsreaktion durchgeführt. Hierfür wurden *insert*- und Vektor-DNA im molaren Verhältnis 3:1 eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µL T4 DNA-Ligase und 2 µL T4 DNA-Ligase Puffer wurde der Reaktionsansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt und bei 16 °C über Nacht inkubiert.

### 2.2.1.10 Sequenzanalyse

Zur Überprüfung der Nukleotidabfolge bestimmter DNA-Abschnitte wurde eine Sequenzierung der Plasmid-DNA mithilfe der Sanger-Methode durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurde folgende Reaktionsmischung gemäß des BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits verwendet (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Reaktionsmischung für die Sequenzierung.**

Plasmid-DNA	0,5 µg
5x Sequenzierungspuffer	2 µL
Big Dye	1 µL
Primer (10 µM)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad. 10 µL

Die Sequenzierungsreaktion wurde im Thermocycler anhand des in Tabelle 15 beschriebenen Temperaturprogramms durchgeführt.

**Tabelle 15: Temperaturprogramm der Sequenzierungsreaktion.**

Prozess	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	1 min	1
Denaturierung	96 °C	10 sec	25
Hybridisierung	50 °C	5 sec	
Elongation	60 °C	4 min	
Lagerung	4 °C	4 min	1

Das Produkt der Sequenzierungsreaktion wurde mit 2 µL 3 M Natriumacetat, 10 µL ddH<sub>2</sub>O und 50 µL absolutem Ethanol (EtOH) versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min bei 20 °C mit 3000 g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µL 70%igem (v/v) EtOH aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 20 °C und 300 g) wurde das Pellet getrocknet und bei 500 g und 20 °C für 1 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 20 µL HiDi (*highly deionized*) Formamid resuspendiert und in der Diagnostikabteilung des Instituts für Humangenetik (UKE, Hamburg) mittels Kapillar-Elektrophorese analysiert.

### 2.2.1.11 Mutagenese

Für die Herstellung neuer Proteinvarianten wurde die zielgerichtete Mutagenese (Einsatz mutagener Primer) verwendet. Dafür wurde ein PCR-Ansatz gemäß Tabelle 16 angesetzt.

**Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Mutagenese.**

Komponente	Volumen (µL)
10x Reaktionspuffer	5
<i>forward</i> Primer (10 µM)	1
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	1
dNTP Mix	1
QuickSolution	3
Plasmid-DNA (10 µM)	0,1
ddH <sub>2</sub> O	38
Polymerase Pfu Ultra	1

Die PCR-Mutagenese wurde anhand des in Tabelle 17 aufgeführten Temperaturprogramms durchgeführt.

**Tabelle 17: Temperaturprogramm für die Mutagenese.**

Prozess	Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1 min	1
Denaturierung	95	50 s	17
Hybridisierung	60	50 s	
Elongation	68	1 min/kb Plasmid	
Abschließende Elongation	68	7 min	1
Lagerung	4	∞	1

Um das Ausgangsplasmid nach der PCR zu verdauen wurde 1 µL des Restriktionsenzym DpnI zu dem Ansatz pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Rekombinante Herstellung His-SUMO-markierter Proteine

Von den transformierten BL21 *E. coli*-Bakterien wurden LB-Vorkulturen (4 mL) mit zugesetztem Antibiotikum bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Vorkulturen wurden jeweils zu 100 mL Komplett-TB-Medium (90 mL TB-Medium und 10 mL TB 10x Salzlösung) gegeben und für ca. 8 h bei 37 ° und 200 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinproduktion über Nacht bei 19 °C erfolgte durch Zugabe von 100 µL 100 mM IPTG. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min pelletiert und in 10 mL nativem Aufreinigungspuffer (1x nativer Puffer + 10 mM Imidazol) resuspendiert. Es wurden 20 mg Lysozym pro Ansatz hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis dreimal für 10 s mit Ultraschall behandelt und für 5 min bei -80 °C eingefroren. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C, 16.000 rpm, 20 min) wurde der Überstand abgenommen, mit 0,5 mL Ni-NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden, Deutschland) versetzt und für 1 h bei 4 °C rotiert. Anschließend wurde die Agarose-Matrix fünfmal mit 5 mL nativem Waschpuffer (1x nativer Puffer + 20 mM Imidazol) gewaschen (jeweils Zentrifugation bei 1500 g und 4 °C für 2 min). Nach dem letzten Waschschrift wurde die Matrix in eine Elutionssäule pipettiert und durch Zugabe von 2,5 mL Elutionslösung (1x nativer Puffer + 250 mM Imidazol) wurde das Zielprotein von der Matrix eluiert. Diese Eluate (E1) wurden mittels Gelfiltration über NAP-25-Säulen (Merck) entsalzt. Hierbei wurden die Säulen zunächst mit Natriumhydrogencarbonat-Puffer (0,2 mM NaCl, 0,1 mM NaHCO<sub>3</sub>) äquilibriert und mit 2,5 mL Eluat beladen. Nach dem Durchfluss des Eluats durch die Säule wurden die Proteine mit 3,5 mL Natriumhydrogencarbonat-Puffer eluiert (E2). Der Proteingehalt wurde durch Zugabe von 90 µL Bradford-Reagenz zu 10 µL Eluat mittels Bradfordassay (photometrische Messung der Absorption bei 595 nm) bestimmt. Zur Überprüfung der Proteinreinigung wurden 20 µL der Elutionsproben E1 und E2 mit 5 µL 5x Lämmli-Puffer versetzt, bei 95 °C für 5 min aufgeköcht und zusammen mit einem Proteinmarker auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie-Lösung für 1 h schüttelnd inkubiert und mittels Entfärber-Lösung über Nacht entfärbt.

### 2.2.2.2 Massen-Photometrie

His-SUMO-markierte Proteine wurden massenphotometrisch im Hinblick auf eine mögliche Multimerisierung untersucht. Dafür wurden die Proteine in einer Konzentration von 20 nM auf eine Glasoberfläche (Deckgläschen) pipettiert und mithilfe eines Massen-Photometers (Refeyn Two MP; Refeyn, Oxford, UK) analysiert.

### 2.2.2.3 Zelllyse von HEK293T-Zellen

Transfizierte 293T-Zellen wurden zweimal mit kalter 1x PBS-Lösung gewaschen und mit 1 mL IP-Puffer mit Proteaseinhibitoren (44 µg/mL PMSF, 10 µg/mL Leupeptin, 2 µg/mL Pepstatin A) versetzt und für 15 min auf Eis unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Lysat wurde bei 4 °C und 20.000 g für 15 min zentrifugiert und der Überstand wurde in 1,5 mL-Reaktionsgefäße transferiert.

### 2.2.2.4 Immunopräzipitation mittels RFP-trap

Für die Immunopräzipitation (IP) wurden 20 µL RFP-trap beads (ChromoTek) in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen vorgelegt und zweimal mit 500 µL kaltem IP-Puffer gewaschen (1000 g, 4 °C, 1 min). Von den 293T-Zelllysaten (2.2.2.1) wurden 50 µL als Inputprobe abgenommen und mit 20 µL 5x Lämmli-Puffer versetzt. Das verbliebene Zelllysate wurde auf die beads pipettiert und bei 4 °C für 2 h unter Rotation inkubiert. Nach fünf Waschschritten (1000 g, 4 °C, 1 min) mit kaltem IP-Puffer wurde der Überstand verworfen und die beads wurden mit 50 µL 1x Lämmli-Puffer resuspendiert (IP-Probe). Die Input- und IP-Proben wurden bei 95 °C und 200 rpm für 5 min inkubiert.

### 2.2.2.5 Western Blot

Als Vorbereitung für Western Blot-Analysen wurde eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) durchgeführt. Hierfür wurden 10%ige Trenngele mit 1 cm hohen Sammelgelen verwendet. Die 1,5 mm-dicken Polyacrylamid-Gele wurden in eine Laufkammer (BioRad, München, Deutschland) gestellt und mit SDS-Laufpuffer bedeckt. Es wurden 18 µL Probe sowie 5 µL Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder) in die Geltaschen aufgetragen. Um die Proben im Sammelgel zu fokussieren, wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Die Trennung der Proteine anhand des Molekulargewichts erfolgte anschließend bei 180 V im Trenngel. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels *Wet-Blot*-Methode auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Hierfür wurde die Transferkammer mit Transferpuffer befüllt und eine Spannung von 100 V für 2 h angelegt. Die Nitrocellulose-Membran wurde mit 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T für 30 min geblockt und anschließend mit primärem Antikörper in 5% Milchpulver in TBS-T bei 4 °C unter Rotation über Nacht inkubiert. Nach drei Waschrissen mit TBS-T für je 10 min wurde die Membran bei RT für 1 h unter leichtem Schwenken mit HRP- (*horseradish peroxidase*) gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschrissen mit TBS-T für je 10 min wurde die Membran mit dem Chemilumineszenz-Substrat WesternBright (Biozym, Hamburg, Deutschland) für 1 min inkubiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels ChemiDoc XRS (BioRad); die Quantifizierung des Blots (Quantifizierung relativer Proteinmengen der IP-Proben) wurde mit der ImageLab-Software (BioRad) durchgeführt.

### 2.2.2.6 Immuncytochemie

Die hippocampalen Rattenneuronen wurden 10 bis 14 Tage nach der Extraktion (DIV10-14) dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 15 min mit 500 µL Fixierungspuffer (4% (w/v) PFA, 4% (w/v) Saccharose) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 500 µL 0,1% (w/v) Triton X-100-Lösung permeabilisiert (3-5 min bei RT). Nach drei weiteren Waschrissen mit PBS wurden die Zellen für 1 h bei RT mit 500 µL 10%igem (v/v) Pferdeserum inkubiert, um unspezifische Antikörperreaktionen zu reduzieren. Die primären Antikörper wurden in 2%igem (v/v) Pferdeserum

angesetzt. Jeweils 100  $\mu\text{L}$  der Antikörperlösung wurden als Tropfen auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen wurden auf den Tropfen platziert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS für jeweils 10 min wurden die Deckgläschen mit den sekundären Antikörpern in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS (10 min) wurden die Deckgläschen einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mithilfe des ProLong™ Diamond Antifade Mounting Medium (mit oder ohne DAPI, Thermo Fisher Scientific) fixiert und über Nacht im Dunklen bei RT inkubiert.

## **2.2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen**

In dieser Arbeit wurden humane embryonale Nierenzellen (engl. *human embryonic kidney cells*) – HEK293T-Zellen – bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in 10 cm-Schalen in DMEM Vollmedium kultiviert. Zellen mit ca. 90%iger Konfluenz wurden auf weitere Kulturgefäße umgesetzt. Für das Passagieren wurden die Zellen mit 10 mL Versene-Lösung gewaschen und mit 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden mit DMEM Vollmedium resuspendiert, auf neue 10 cm-Schalen ausplattiert und mit DMEM auf 10 mL Volumen aufgefüllt.

### **2.2.3.2 Transfektion von HEK293T-Zellen**

293T-Zellen mit einer Konfluenz von ca. 50% wurden mittels Transfektionsreagenz TurboFect (Thermo Fisher Scientific) mit den gewünschten Plasmiden transfiziert. Hierbei wurde ein Transfektionsmix bestehend aus 950  $\mu\text{L}$  serumfreien DMEM Medium, 18  $\mu\text{L}$  TurboFect und je 4  $\mu\text{g}$  DNA angesetzt und vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsmix tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellen wurden bei 37 °C für 24 h inkubiert.

### **2.2.3.3 Zellkultur primärer hippocampaler Neuronen**

Zur Isolierung hippocampaler Neuronen aus Embryonen wurde eine tragende Ratte mit CO<sub>2</sub> eingeschlüfert und mittels Guillotine dekapitiert. Nach Öffnen der Bauchdecke wurde der Uterus entnommen und die Embryonen (E18) wurden aus den Fruchtblasen isoliert und dakapitiert. Die Gehirne wurden freigelegt und in HBSS transferiert. Unter Verwendung eines Binokulars wurden die Hemisphären separiert und die Hirnhaut abgetrennt. Die Hippocampi wurden isoliert, in 4,5 mL HBSS aufgenommen und mit 500  $\mu\text{L}$  10x Papain versetzt. Die Hippocampi wurden dann für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach fünf Waschschritten der Hippocampi mit jeweils 7 mL Plattiermedium wurden die Neuronen durch triturieren mit Pasteurpipetten unterschiedlicher Öffnungsgröße vereinzelt, mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und auf PLL-beschichteten 12 *well*-Schalen ausplattiert (375.000 Zellen/mL). Die Neuronen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Plattiermedium durch 1 mL Neurobasal Medium pro *well* ersetzt.

#### **2.2.3.4 Transfektion von hippocampalen Neuronen**

7 Tage nach der Extraktion (DIV7) wurden die hippocampalen Neuronen mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. 1 h vor der Transfektion wurde das Neurobasal Medium abgenommen, aufbewahrt und durch 500 µL Transfektionsmedium pro *well* ersetzt. Es wurde ein Transfektionsansatz mit je 5 µg DNA und 10 µL 2,5 M CaCl<sub>2</sub> hergestellt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt. Die Zugabe von 100 µL 2x HBS erfolgte unter kontinuierlichem Vermischen tröpfchenweise. Der Transfektionsansatz wurde bei RT für 30 min inkubiert und 100 µL wurden pro *well* einer 12 *well*-Platte eingesetzt. Die Neuronen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 2 h inkubiert und anschließend 7x mit HBSS gewaschen. Das aufbewahrte Neurobasal Medium wurde zu den Zellen gegeben und diese wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Im Fall der Zn<sup>2+</sup>-Behandlung wurden die Neuronen einen Tag nach der Transfektion (DIV8) mit zusätzlichem 10 µM ZnCl<sub>2</sub> für 3,5 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **2.2.3.5 Präparation der postsynaptischen Dichte aus dem Gehirn adulter Mäuse**

Für die Isolierung der postsynaptischen Dichte wurden adulte Mäuse mit CO<sub>2</sub> betäubt und dann dekapitiert. Die Schädeldecke wurde geöffnet und das Gehirn freigelegt. Nach Trennung der Gehirnhälften wurde jeweils der Cortex sowie der Hippocampus entnommen. Cortices und Hippocampi wurden im weiteren experimentellen Verlauf separat voneinander parallel präpariert. Cortices und Hippocampi von 5 Mäusen wurden jeweils vereinigt und nach Zugabe von je 3 mL Lösung A lysiert und mithilfe eines Potters mechanisch homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 10 min bei 1400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aufbewahrt und das Pellet wurde in 3 mL Lösung A resuspendiert und erneut bei 1400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände aus beiden Zentrifugationsschritten wurden vereinigt und bei 710 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. 100 µL des Überstandes wurden mit 25 µL 5x Lämmli-Puffer versetzt und als P1-Probe (postnukleäre Fraktion) aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde für die Sedimentation der Synaptosomen und Mitochondrien bei 13.800 g, und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 3 mL Lösung B resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 200 µL abgenommen und mit 50 µL 5x Lämmli-Puffer versetzt (P2-Probe; Membranenfraktion). Die restliche Probe wurde auf einen Saccharose-Stufengradienten aufgetragen. Für den Saccharose-Gradienten wurden 1,2 M, 1 M und 0,85 M Saccharose-Lösungen (in dieser Reihenfolge) langsam in einem Ultrazentrifugationsröhrchen überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte für 2 h bei 82.500 g und 4 °C. Die Fraktion der Synaptosomen befand sich zwischen der 1 M und 1,2 M Saccharoseschicht und wurde mittels Einweg-Pasteurpipette vorsichtig isoliert und mit Lösung B auf 5 mL aufgefüllt. 15 mL Lösung C wurden dazugegeben und die Lösung wurde 30 min bei 4 °C rotiert und dann bei 32.800 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet, das die PSD-Proteine enthielt, wurde in 300 µL Lösung B resuspendiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

#### **2.2.4 Mikroskopie**

##### **2.2.4.1 Konfokale Mikroskopie**

Es wurde das konfokale Mikroskop Sp5 der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Bilder wurden mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv aufgenommen.

##### **2.2.4.2 STED-Mikroskopie**

STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*) wurde mit einem STED-Mikroskop von Abberior durchgeführt. Die STED-Bilder wurden mit einer Pixelgröße von 20 nm und einem Scanning-Bereich von ca. 15 µm aufgenommen.

### 2.2.4.3 FRET-Lebendzellmessungen

Für FRET- (Förster-Resonanzenergietransfer) Lebendzellmessungen wurden 293T-Zellen mit FRET-Konstrukten in Lebendzellmikroskopie-Kammern transfiziert und am darauffolgenden Tag in 1,5 mL HBSS (ohne Phenolrot) für 1 min live hinsichtlich eines FRET-Effektes mithilfe des konfokalen Mikroskops Sp5 analysiert. Der FRET-Koeffizient wurde in dem aufgenommenen Bild Punkt für Punkt mithilfe der folgenden Formel errechnet:

$$\text{FRET Koeffizient} = \frac{\text{Akzeptorkanal } \textit{unmixed}}{(\text{Donorkanal} + \text{Akzeptorkanal } \textit{unmixed})}$$

Der Werte des FRET-Koeffizienten rangieren zwischen 0 und 1. Um die Werte als *8-bit* Bilder darstellen zu können, wurden die Werte zwischen 0 und 255 reskaliert. Der Wert 1 (255) stellt die maximale FRET-Effizienz dar, während 0 äquivalent zu keinem detektierbaren FRET-Effekt zu betrachten ist.

### 2.2.5 Auswertung und Statistik

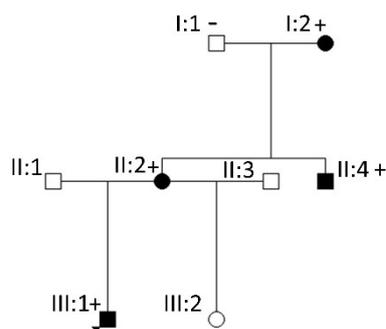
Die quantitative Auswertung der Mikroskopiebilder (konfokal und STED) erfolgte mittels ImageJ (USA). Für die Zählung primärer Dendriten wurde um den Zellkörper der Neuronen ein Ring mit einem Radius von 10 µm gezogen. Die Anzahl der Ring-kreuzenden Dendriten wurde als die Anzahl der primären Dendriten festgelegt. Für die Zählung von Shank-Clustern wurden dendritische Abschnitte mit einer minimalen radialen Distanz von 20 µm zum Zellkörper analysiert. Für die Quantifizierung der Cluster wurde das *Multi-Point tool* von ImageJ verwendet. Die Distanz zwischen dem Kopf eines dendritischen Dorns und dem dendritischen Schaft sowie der Cluster-Durchmesser wurden mit dem *Straight line tool* von ImageJ gemessen. Die Auswertung der FRET-Effizienz wurde mit der Imaris-Software (Belfast, UK) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mit dem Programm Graph Pad Prism8 (San Diego, USA) ermittelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung von *SHANK3*-*missense*-Mutationen

##### 3.1.1 Eine *missense*-Mutation in den Ankyrin-Wiederholungen resultiert in einem ADHS-ähnlichen Phänotyp

In Kooperation mit der Humangenetikerin Christina Fagerberg (Department of Clinical Genetics, University Hospital Odense, Dänemark) konnte mittels Exom-Sequenzierung eine Familie identifiziert werden, in der mehrere Individuen mit der heterozygot vorliegenden *SHANK3*-*missense*-Mutation L270M eine Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) bzw. ADHS-ähnliches Verhalten aufwiesen (Abbildung 6). Der Ausgangspatient (ein 12-jähriger Junge) zeigte eine Lernbehinderung, zwanghafte Resistenz gegenüber alltäglichen Auf- und Anforderungen und erfüllte die Kriterien für eine oppositionelle Verhaltensstörung (*oppositional defiant disorder*, ODD). Die Mutter des Ausgangspatienten wies eine Lernbehinderung sowie ADHS und eine Borderline-Persönlichkeitsstörung auf; bei dem Onkel mütterlicherseits wurde ebenfalls in dessen Jugend ADHS diagnostiziert. Zu der Großmutter mütterlicherseits lagen nur eine sehr begrenzte Menge an Informationen vor, allerdings wurde sie als cholerisch beschrieben (eine detailliertere klinische Beschreibung der Patientenfamilie ist dem Supplement von Woike *et al.*, 2022 zu entnehmen).



**Abbildung 6: Stammbaum der Familie mit der *SHANK3*-*missense*-Variante L270M.**

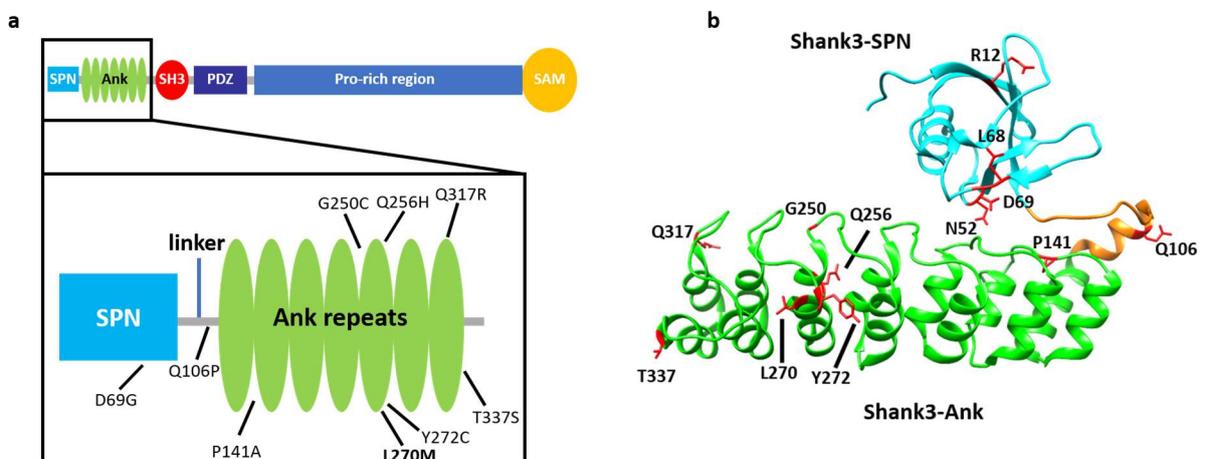
± zeigt An- bzw. Abwesenheit der Variante an. Der schwarze Pfeil markiert den Ausgangspatienten.

Um die Pathogenität dieser neuartigen Variante mit milderem Phänotyp zu überprüfen, wurde die L270M-Mutation funktionell charakterisiert und mit weiteren Varianten des *SHANK3*-Gens, die mit Autismus-Spektrum-Störungen oder geistiger Behinderung assoziiert wurden (Tabelle 18), verglichen. Es wurden alle Patienten-*missense*-Mutationen der N-terminalen Region von Shank3 in die Analyse mitaufgenommen, die zuvor noch nicht funktionell untersucht worden waren. Hierfür wurden alle unerforschten *missense*-Mutationen der SPN-Domäne oder der Ankyrin-Wiederholungen aus der ClinVar-Datenbank miteinbezogen. Um zu überprüfen, dass es sich bei den Mutationen nicht um Polymorphismen im *SHANK3*-Gen handelte, wurde die Abwesenheit der Varianten in der gnomAD-Datenbank (125.748 Exomsequenzen und 15.708 Gesamtgenomsequenzen) sichergestellt. Nur eine der auf diesem Weg gefundenen Varianten (P141A; führt zu einem autistischen Phänotyp) war zuvor bereits in der Fachliteratur publiziert, aber nicht funktionell charakterisiert worden. Die in ClinVar enthaltene Variante I245T wurde aus der Analyse ausgenommen, da diese mehrfach in der gnomAD-Datenbank zu finden war. Insgesamt wurde ein Set aus neun bisher unerforschten *missense*-Mutationen verschiedenen funktionellen Assays unterzogen. Nur eine dieser Mutationen betraf die SPN-Domäne (D69G); die weiteren acht Mutationen befanden sich in den Ankyrin-Wiederholungen bzw. in der Linker-Region (Abbildung 7).

**Tabelle 18: Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten *SHANK3*-missense-Mutationen.**

\*Einige Einträge in ClinVar geben für die *SHANK3*-Varianten das Phelan-McDermid-Syndrom (oder alternativ das 22q13 Deletionssyndrom) als Phänotyp an, obwohl *missense*-Mutationen vorliegen. Das Phelan-McDermid-Syndrom ist gekennzeichnet durch geistige Behinderung, globale Entwicklungsstörungen sowie Autismus.

Variante, Domäne	Quelle	Phänotyp	Vererbung
D69G, SPN	ClinVar	Autismus	<i>De novo</i>
Q106P, Linker	ClinVar	Phelan McDermid-Syndrom*	Keine Angaben
P141A, Ank	Boccuto <i>et al.</i> , 2013	Autismus, Entwicklungsverzögerung, Anfälle	<i>De novo</i>
G250C, Ank	ClinVar	Keine Angaben	Keine Angaben
Q256H, Ank	ClinVar	Keine Angaben	Keine Angaben
	Christina Fagerberg	Lernbehinderung, Oppositionelle Verhaltensstörung, ADHS-ähnliches Verhalten	Vererbt
Y272C, Ank	ClinVar	Phelan McDermid-Syndrom*	Keine Angaben
Q317R, Ank	ClinVar	Keine Angaben verfügbar	Keine Angaben
	ClinVar	22q13 Deletionssyndrom*	Vererbt



**Abbildung 7: Shank3-Domänenstruktur (a) und 3D-Struktur des Shank3-N-Terminus (b).**

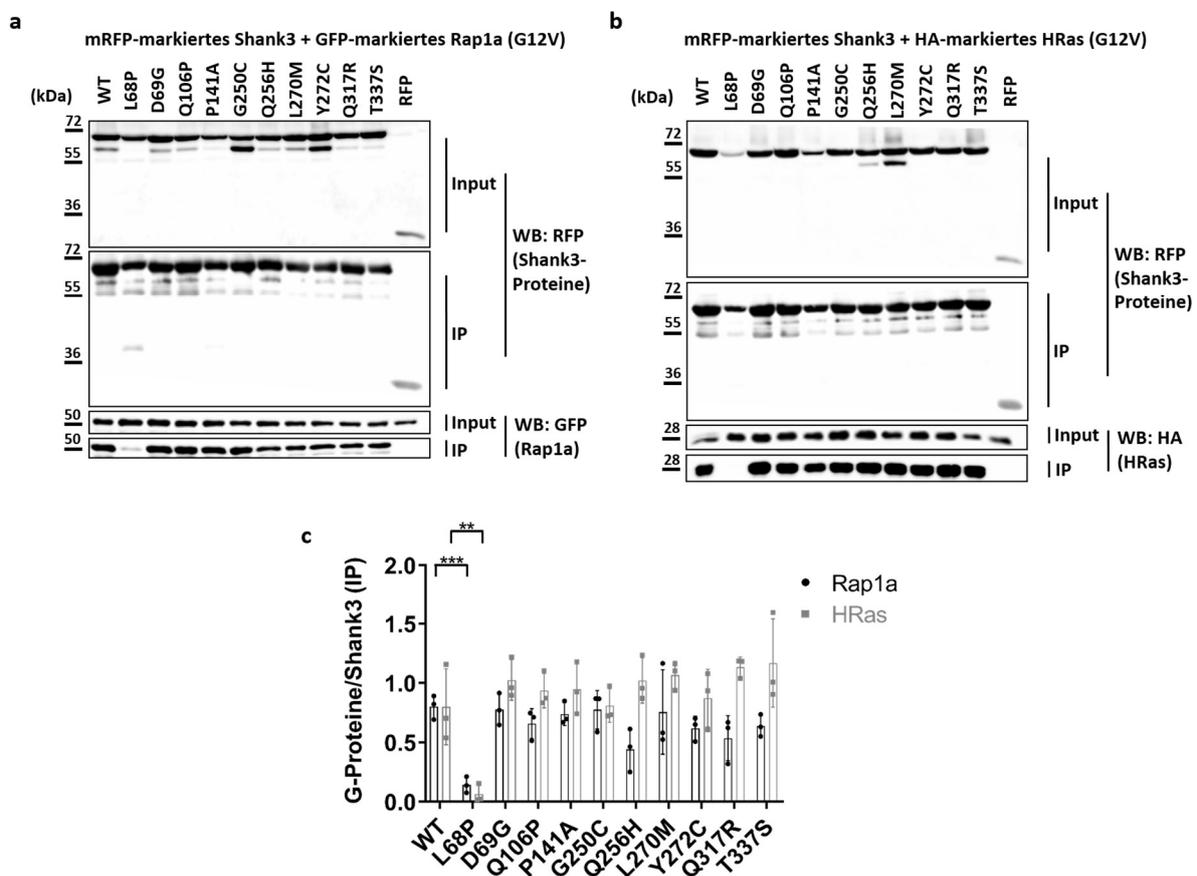
Die Positionen der N-terminalen *missense*-Mutationen sind jeweils eingezeichnet. Die meisten Mutationen betreffen die Ankyrin-Wiederholungen, nur D69G betrifft die SPN-Domäne und Q106P befindet sich in der 19 Aminosäuren langen Linker-Region zwischen den Domänen. Das 3D-Modell (b) basiert auf der Kristallstruktur des Shank3-N-Terminus (5G4X).

Für die funktionelle Analyse der *missense*-Mutationen wurden mehrere Interaktionsstudien mit bekannten Bindungspartnern des Shank3-N-Terminus durchgeführt. Hierfür wurden die Mutationen mittels Mutagenese-PCR in ein Expressionskonstrukt eingebracht, das für den Shank3-N-Terminus (SPN-Domäne und Ankyrin-Wiederholungen, Sequenz aus der Ratte) als mRFP-Fusionsprotein codierte. Das WT-Konstrukt sowie die Mutanten wurden zusammen mit den Interaktionspartnern in HEK293T-Zellen koexprimiert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die mRFP-markierten Shank-Proteine wurden mittels RFP-*trap*-Matrix koimmunpräzipitiert. Sowohl die Input- als

auch die IP-Proben wurden hinsichtlich der Menge an Shank3 und dessen jeweiligem Interaktionspartner via Western Blot analysiert.

### 3.1.2 Die Mutationen in *Shank3* beeinflussen die Bindung an Rap1a und HRas nicht

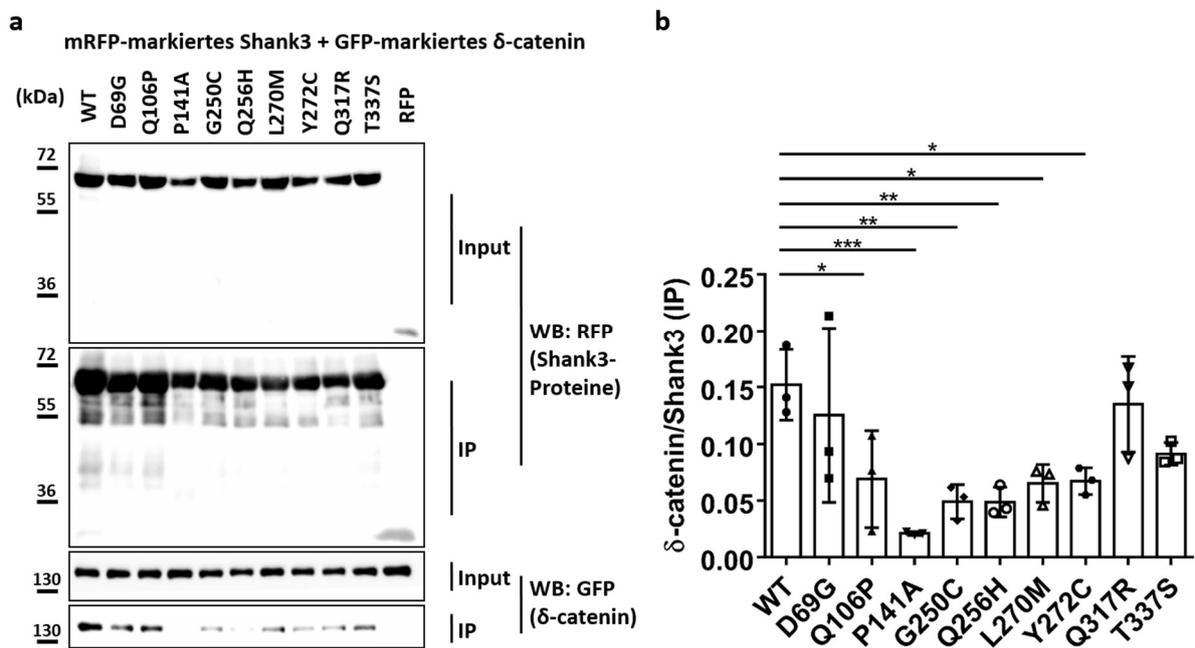
Zuerst wurde die Bindung der kleinen G-Proteine Rap1a (als GFP-markierte, konstitutiv-aktive G12V-Variante) und HRas (als HA-markierte, konstitutiv-aktive G12V-Variante) an die mutierten Shank3-Proteine untersucht. In vorherigen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass beide Proteine in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form an die SPN-Domäne der Shank-Proteine binden (Lilja *et al.*, 2017). Die L68P-Variante, für die bereits ein Verlust der Bindung an beide G-Proteine publiziert worden war, wurde als Negativkontrolle in das experimentelle Setup mitaufgenommen (Lilja *et al.*, 2017). Mit Ausnahme der Negativkontrolle L68P führten alle Shank3-Varianten zu einer effektiven Koimmunpräzipitation von HRas und Rap1a (Abbildung 8a+b). Ausgehend von der quantitativen Analyse der Western Blots lässt sich ableiten, dass keine der neuen *missense*-Mutationen die G-Protein-Bindung an die SPN-Domäne signifikant beeinflusst (Abbildung 8c).



**Abbildung 8: Die *missense*-Varianten des Shank3-N-Terminus interagierten mit den kleinen G-Proteinen.** RFP-markierte Varianten des Shank3-N-Terminus (SPN + Ank), sowie RFP allein, wurden in 293T-Zellen mit aktiven G12V-Varianten der G-Proteine Rap1a (GFP-markiert, (a)) und HRas (HA-markiert, (b)) koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-*trap*-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert. (c) Quantitative Analyse der Daten aus (a) und (b). Die Signalintensitäten der G-Proteine wurden durch die Signalintensitäten der RFP-Shank3-Proteine geteilt. \*\*,\*\*\* Signifikant abweichend vom WT, p<0,01, p<0,001; Daten aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

### 3.1.3 Missense-Mutationen in den Ankyrin-Wiederholungen verringern die Bindung an $\delta$ -Catenin

$\delta$ -Catenin konnte von der AG Kreienkamp als neuer postsynaptischer Interaktionspartner des Shank3 N-Terminus identifiziert werden (Hassani Nia *et al.*, 2020b). Um die Auswirkungen der *missense*-Varianten auf diese Bindung zu untersuchen, wurde GFP-markiertes  $\delta$ -Catenin zusammen mit den RFP-markierten N-terminalen Shank3-Varianten in 293T-Zellen koexprimiert (Abbildung 9a). Während die in der SPN-Domäne gelegene D69G-Mutation die Interaktion im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinflusste, führten sechs Mutationen der Ankyrin-Wiederholungen (Q106P bis Y272C, darunter auch L270M) zu einer signifikant verringerten Bindung an  $\delta$ -Catenin (Abbildung 9b). Dieses Ergebnis stand im Einklang mit unserer vorausgegangenen Studie, in der die Ankyrin-Wiederholungen als Bindungsstelle für  $\delta$ -Catenin identifiziert worden waren (Hassani Nia *et al.*, 2020b). Die Mutationen Q317R und T337S zeigten keinen Einfluss auf die  $\delta$ -Catenin-Interaktion. Beide Mutationen sind in der siebten Ankyrin-Wiederholung lokalisiert, sodass gemutmaßt werden konnte, dass dieser Bereich der Ank-Region nicht wesentlich an der Bindung an  $\delta$ -Catenin beteiligt ist.

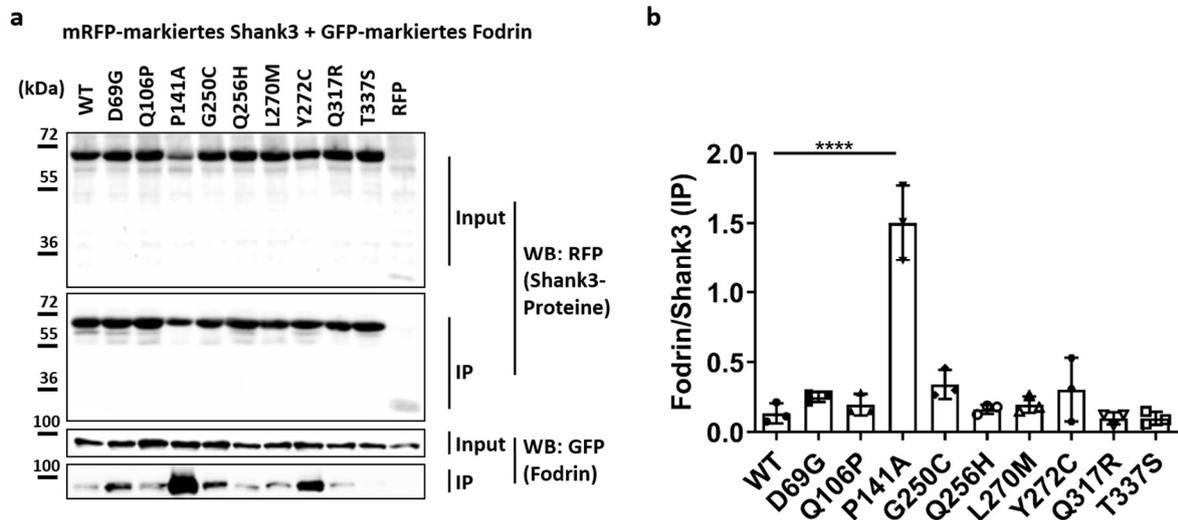


**Abbildung 9: Mehrere Mutationen in den Ankyrin-Wiederholungen führen zu einer reduzierten  $\delta$ -Catenin-Interaktion.** (a) RFP-markierte Varianten des Shank3-N-Terminus (SPN + Ank), sowie RFP allein, wurden in 293T-Zellen mit  $\delta$ -Catenin (GFP-markiert) koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-*trap*-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert. (b) Quantitative Analyse der Daten aus (a). Die Signalintensitäten von  $\delta$ -Catenin wurden durch die Signalintensitäten der RFP-Shank3-Proteine geteilt. \*, \*\*, \*\*\* Signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ; Daten aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

### 3.1.4 Die P141A-Mutation verstärkt die Bindung der Ankyrin-Wiederholungen an $\alpha$ -Fodrin immens

Als nächster postsynaptischer Interaktionspartner des Shank3-N-Terminus wurde das cytoskeletale Protein  $\alpha$ -Fodrin ausgewählt.  $\alpha$ -Fodrin konnte bereits als Bindungspartner der Ank-Wiederholungen etabliert werden (Böckers *et al.*, 2001). Allerdings zeigten biochemische und strukturelle Daten der AG Kreienkamp, dass die SPN-Domäne diese Bindung eine intramolekulare Interaktion mit den Ankyrin-Wiederholungen blockiert (Lilja *et al.*, 2017; Mameza *et al.*, 2013). Auch aus dem hier gezeigten Ko-IP-Experiment, für das GFP-markiertes  $\alpha$ -Fodrin zusammen mit RFP-markierten N-terminalen Shank3-

Varianten in 293T-Zellen koexprimiert wurde, geht hervor, dass der Shank3-N-Terminus (WT) nur sehr schwach an  $\alpha$ -Fodrin bindet (Abbildung 10a). Allerdings konnte für die in den Ank-Wiederholungen lokalisierte P141A-Mutation ein starker Anstieg der  $\alpha$ -Fodrin-Bindung festgestellt werden (Abbildung 10b). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die P141A-Mutation die SPN-Ank-Tandemstruktur öffnen und so die Ankyrin-Wiederholungen freilegen könnte, was eine verstärkte  $\alpha$ -Fodrin-Bindung ermöglichen könnte. Keine weitere *missense*-Mutation wirkte sich signifikant auf die  $\alpha$ -Fodrin-Interaktion aus.

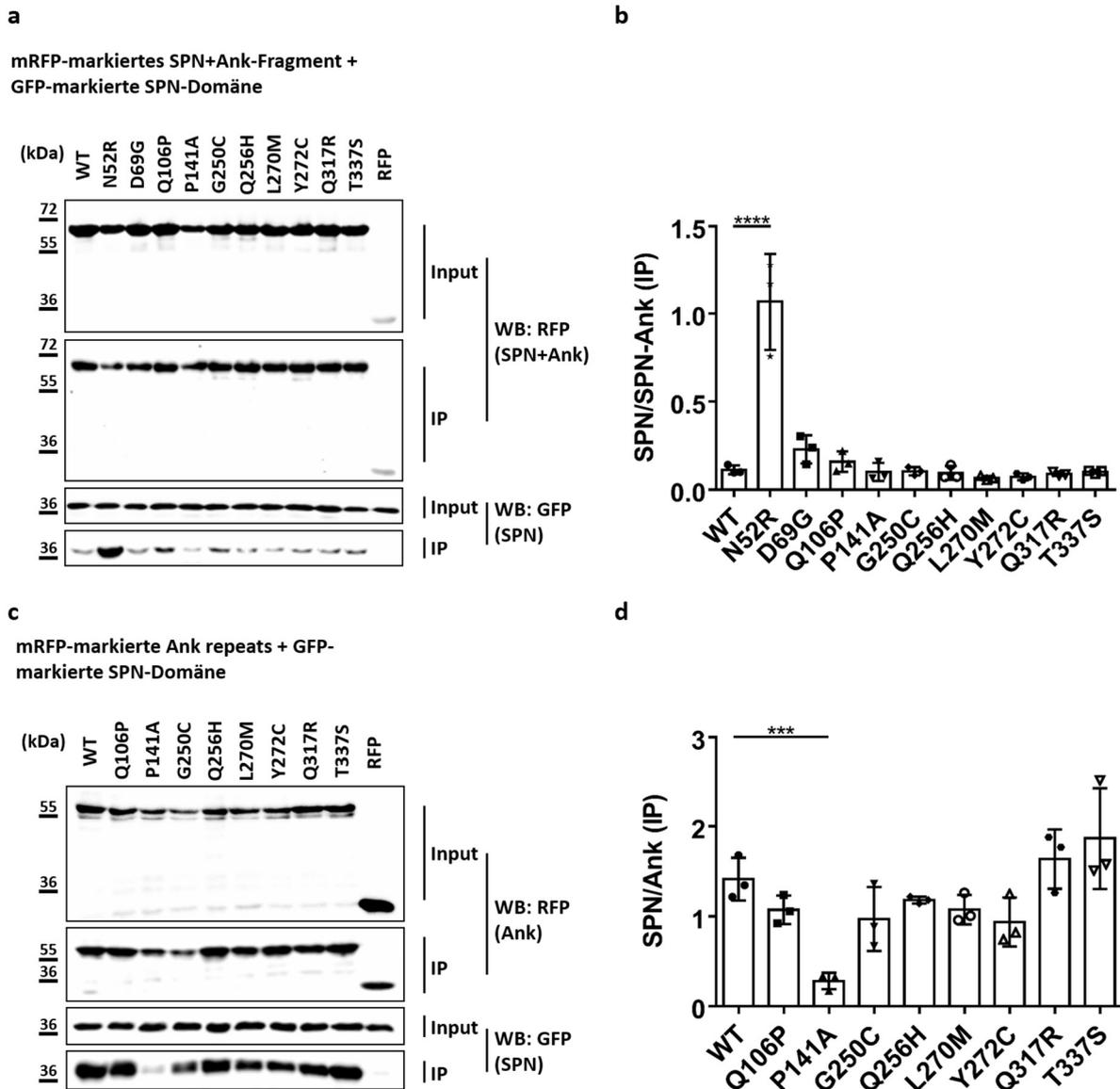


**Abbildung 10: Die P141A *missense*-Mutation führt zu einer verstärkten Interaktion mit  $\alpha$ -Fodrin.** (a) RFP-markierte Varianten des Shank3-N-Terminus (SPN + Ank), sowie RFP allein, wurden in 293T-Zellen mit  $\alpha$ -Fodrin (GFP-markiert) koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-*trap*-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert. (b) Quantitative Analyse der Daten aus (a). Die Signalintensitäten von  $\alpha$ -Fodrin in den IP-Proben wurden durch die Signalintensitäten der RFP-Shank3-Proteine geteilt. \*\*\*\* Signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,0001$ ; Daten aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

### 3.1.5 Die P141A-Mutation interferiert mit der intramolekularen Interaktion innerhalb des Shank3-N-Terminus

Ausgehend von der verstärkten  $\alpha$ -Fodrin-Bindung der P141A-Variante ging ich der Frage nach, ob *missense*-Mutationen den intramolekularen Kontakt zwischen SPN-Domäne und den Ankyrin-Wiederholungen beeinflussen könnten. Hierfür wurden in einem ersten Schritt die GFP-markierte SPN-Domäne zusammen mit den RFP-markierten N-terminalen Shank3-Fragmenten (SPN + Ank; WT und Mutanten) in 293T-Zellen koexprimiert, um zu überprüfen, ob die Mutationen zu einer Öffnung der SPN-Ank-Faltung führen, die dann die Bindung der exogenen (GFP-markierten) SPN-Domäne an die freien Ank-Wiederholungen ermöglichen würde. Als Positivkontrolle wurde ein RFP-markiertes N52R-Konstrukt (SPN + Ank) eingesetzt. Der Austausch von Asparagin52 zu Arginin war basierend auf der 3D-Struktur des Shank3-N-Terminus von Igor Barsukov (Liverpool, UK) vorgeschlagen worden, um über den Einbau einer zusätzlichen positiven Ladung (Arginin) an der Schnittstelle von SPN-Domäne und den Ank-Wiederholungen die Interaktion zwischen beiden Domänen abzuschwächen. Es konnte bereits zuvor in der AG Kreienkamp demonstriert werden, dass die N52R-Mutation die SPN-Ank-Tandemstruktur aufbricht (Salomaa *et al.*, 2021). In dem Ko-IP-Experiment mit GFP-markierter SPN-Domäne und RFP-markierten Fragmenten des gesamten Shank3-N-Terminus zeigte nur die Positivkontrolle N52R einen signifikanten Anstieg der Bindung der exogenen SPN-Domäne an den N-Terminus (Abbildung 11a+b). Da dieser Ansatz allerdings nicht dazu geeignet war, eine Öffnung der N-terminalen Faltung aufgrund eines Affinitätsverlusts zwischen SPN-Domäne und den Ank-Wiederholungen (beispielsweise durch eine Mutation in der Ank-Region) zu detektieren, wurde in

einem zweiten Schritt direkt die Interaktion zwischen GFP-markierter SPN-Domäne und RFP-markierten Ank-Wiederholungen in 293T-Zellen untersucht (Abbildung 11c+d). In diesem Fall führte die P141A-Mutation zu einem Verlust der Interaktion mit der SPN-Domäne. Durch dieses Ergebnis konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die P141A-Mutation den intramolekularen SPN-Ank-Kontakt stört und somit eine verstärkte  $\alpha$ -Fodrin-Bindung an die Ank-Region ermöglicht.

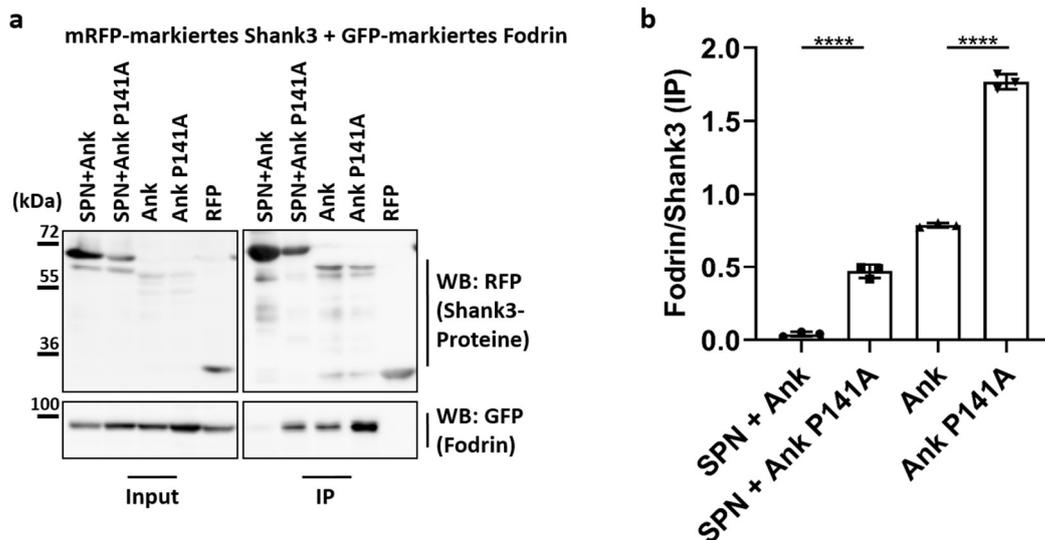


**Abbildung 11: Die P141A-Mutation stört den intramolekularen SPN-Ank-Kontakt.** (a) RFP-markierte Varianten des Shank3-N-Terminus (SPN + Ank), sowie RFP allein, wurden in 293T-Zellen mit der GFP-markierten SPN-Domäne koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-*trap*-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert. (b) Quantitative Analyse der Daten aus (a). Die Signalintensitäten der GFP-SPN-Domäne wurden durch die Signalintensitäten der RFP-Shank3-Proteine geteilt. (c) Das Experiment aus (a) wurde mit RFP-markierten Konstrukten wiederholt, die nur für die Ankyrin-Wiederholungen codierten. (d) Quantitative Analyse der Daten aus (c). \*\*\*, \*\*\*\* Signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$ ; Daten aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

### 3.1.6 Der Aminosäureaustausch P141 zu A141 in den Ankyrin-Wiederholungen verstärkt die $\alpha$ -Fodrin-Interaktion spezifisch

Um herauszufinden, ob der Verlust des intramolekularen SPN-Ank-Kontaktes allein für die verstärkte  $\alpha$ -Fodrin-Bindung der P141A-Variante sorgt oder ob zudem der Austausch des Aminosäurerestes P141

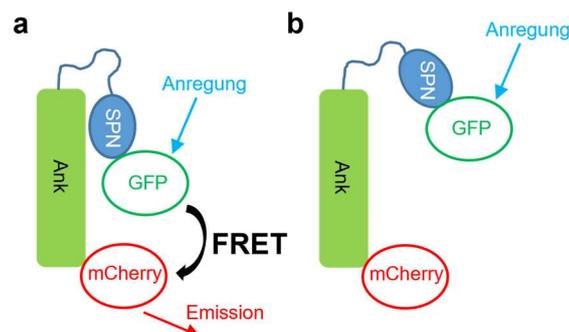
gegen Alanin die Affinität der Ankyrin-Wiederholungen für  $\alpha$ -Fodrin zusätzlich erhöht, wurde ein weiteres Ko-IP-Experiment durchgeführt. Hierbei wurde neben dem RFP-markierte Shank3-N-Terminus (WT, P141A) auch ein RFP-markiertes Ank-Konstrukt (WT, P141A) jeweils zusammen mit GFP-markiertem  $\alpha$ -Fodrin koexprimiert (Abbildung 12). Erneut zeigte sich, dass die P141A-Mutation die Bindung des Shank3-N-Terminus an  $\alpha$ -Fodrin sehr verstärkt. Interessanterweise beobachtete ich, dass die P141A-Mutation die Affinität der Ankyrin-Wiederholungen für  $\alpha$ -Fodrin signifikant erhöhte. Demnach beruht die verstärkte  $\alpha$ -Fodrin-Bindung der P141A-Variante auf zwei Effekten: 1) P141A interferiert mit dem SPN-Ank-Kontakt und ermöglicht so die Bindung von  $\alpha$ -Fodrin an die Ank und 2) die P141A-Mutation erhöht die Affinität der Ank-Region für  $\alpha$ -Fodrin.



**Abbildung 12: Die P141A-Mutation erhöht die Affinität der Ankyrin-Wiederholungen für  $\alpha$ -Fodrin.** (a) RFP-markierte Shank3-Proteine (SPN + Ank sowie Ank allein; jeweils WT und P141A), sowie RFP allein, wurden in 293T-Zellen mit GFP-markiertem  $\alpha$ -Fodrin koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-*trap*-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert. (b) Quantitative Analyse der Daten aus (a). Die Signalintensitäten von  $\alpha$ -Fodrin wurden durch die Signalintensitäten der RFP-Shank3-Proteine geteilt. \*\*\*\* Signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,0001$ ; Daten aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

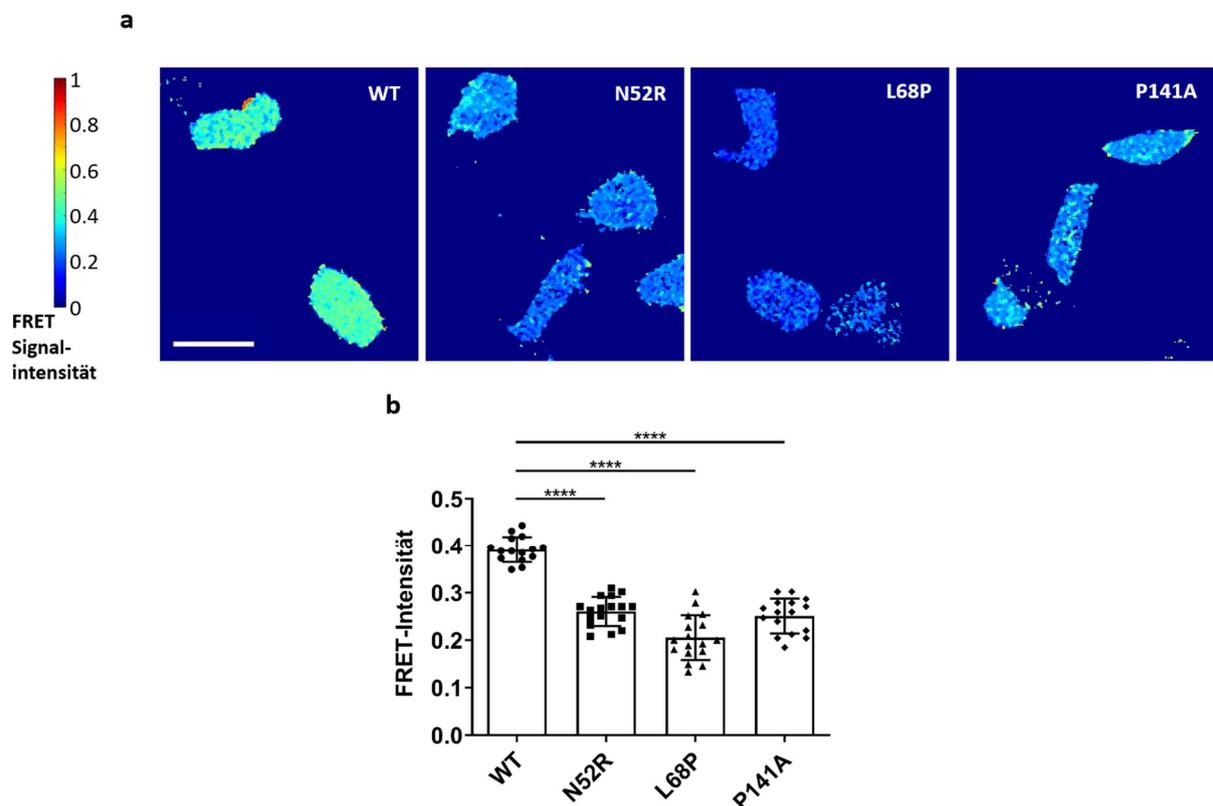
### 3.1.7 Verschiedene *missense*-Mutationen führen zu einer Öffnung des SPN-Ank-Tandems

Um zu demonstrieren, dass Patientenmutationen (wie P141A) tatsächlich zu einer Öffnung der SPN-Ank-Konformation führen können, wurde die biophysikalische Methode des FRET *live cell imagings* (Lebendzellmessungen) angewandt. Es wurden FRET-Reporter-Konstrukte hergestellt, die für ein Fusionsprotein aus N-terminalem GFP, dem Shank3-N-Terminus und C-terminalem mCherry codierten (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Prinzip des FRET-Assays.** (a) Geschlossene Konformation des Shank3-NT. Der GFP-Donor wird optisch angeregt und aufgrund der räumlichen Nähe zum mCherry-Akzeptor (Distanz  $\leq 10$  nm) kann ein FRET erfolgen, sodass mCherry rotes Licht emittiert. (b) Wird die Konformation geöffnet, findet kein FRET mehr statt.

Basierend auf der Kristallstruktur des Shank3-N-Terminus vermutete ich, dass N- (SPN) und C-Terminus (Ank) des Proteinfragmentes sich in enger räumlicher Nähe befinden und somit einen intramolekularen Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) vom GFP-Donor-Fluorophor auf das mCherry-Akzeptor-Fluorophor ermöglichen würden, den man mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisieren könnte. Tatsächlich konnte nach der Expression des WT-FRET-Konstruktes in HEK293T-Zellen eine hohe FRET-Effizienz gemessen werden (ca. 40%), sodass biophysikalisch bestätigt werden konnte, dass sich beide Fluorophore innerhalb der SPN-Ank-Tandemstruktur in enger räumlicher Nähe befinden (Abbildung 14). Da mit Hilfe eines Ko-IP-Experimentes bereits gezeigt wurde, dass die P141A-Mutation die intramolekularen Interaktionen zwischen SPN-Domäne und Ank-Wiederholungen stört (siehe 3.1.5), wurde diese Variante ebenfalls als FRET-Konstrukt in 293T-Zellen transfiziert und analysiert. Zudem wurden zwei Kontrollen hinzugezogen, von denen man annehmen konnte, dass sie mit der Ausbildung eines FRET-Effektes interferieren könnten: N52R (siehe 3.1.5) und L68P (eine Patientenmutation, die zu einer Entfaltung der SPN-Domäne führt (Mameza *et al.*, 2013 und Bucher *et al.*, 2021)). Für die P141A-Variante (FRET-Effizienz von 26%) wurde ebenso wie für die Kontrollen N52R und L68P (FRET-Effizienzen von 20% bzw. 25%) eine im Vergleich zum WT signifikant verringerte FRET-Intensität gemessen, sodass gezeigt werden konnte, dass die P141A-Mutation zu einer Öffnung der ansonsten geschlossenen SPN-Ank-Konformation führt (Abbildung 14).



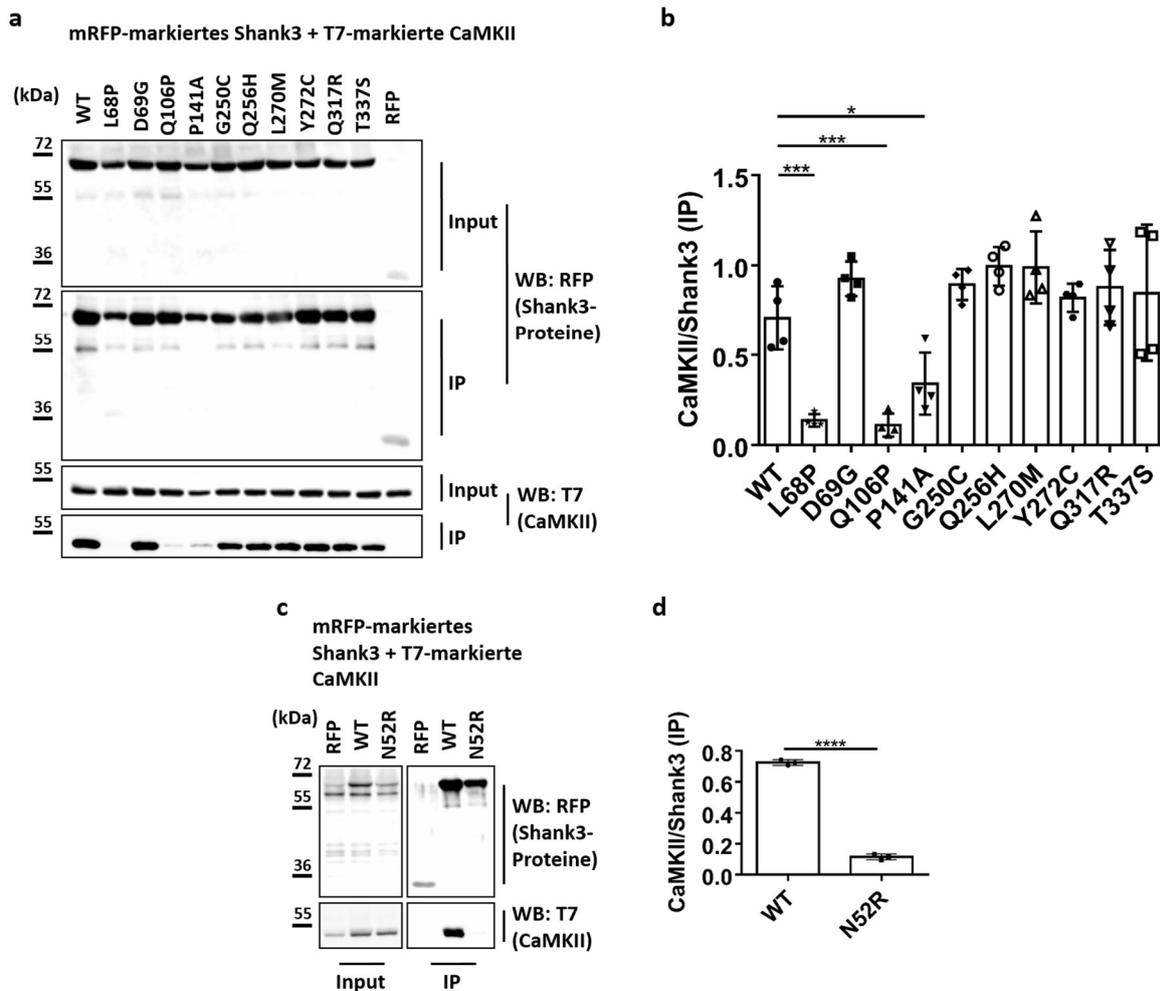
**Abbildung 14: Missense-Mutationen ermöglichen die Öffnung der SPN-Ank-Tandemstruktur.** (a) 293T-Zellen wurden mit den FRET-Konstrukten, die für den Shank3-N-Terminus (WT und Mutanten) codierten, mit N-terminalem GFP-tag und C-terminalem mCherry-tag transfiziert und via FRET-Lebendzellmessungen analysiert (Skalierungsbalken: 50  $\mu\text{m}$ ). Die FRET-Intensität wurde nach 1 min verglichen. Innerhalb des Farbcodes der FRET-Signalintensität (links) repräsentiert dunkelblau ein geringes FRET-Signal (FRET = 0), während dunkelrot für ein hohes FRET-Signal (FRET = 1) steht. (b) Quantitative Analyse der Zellen aus (a). \*\*\*\* Signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,0001$ ; Analyse von  $n = 15-17$  Zellen aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

### 3.1.8 Die *missense*-Mutationen L68P, Q106P und P141A beeinträchtigen die Bindung an die CaMKII $\alpha$

Aus einer kürzlich erschienenen Publikation ging hervor, dass die  $\alpha$ -Untereinheit der inaktiven, nicht-phosphorylierten Form der CaMKII einen Interaktionspartner des Shank3-N-Terminus darstellt (Cai *et al.*, 2020). Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Bindungspartnern interagiert die CaMKII $\alpha$  nicht mit einer distinkten Domäne von Shank3, sondern bindet sowohl an die Linker-Region, die beide N-terminale Domänen verbindet, als auch an die SPN-Domäne. Um den Einfluss der neuen *missense*-Mutationen auf die CaMKII $\alpha$ -Interaktion zu untersuchen, wurde T7-markierte CaMKII $\alpha$  zusammen mit den RFP-markierten N-terminalen Shank3-Varianten in 293T-Zellen koexprimiert. Es konnte für die CaMKII $\alpha$  in Anwesenheit des WT-Fragments eine starke Kopräzipitation festgestellt werden, sodass die Ergebnisse von Cai *et al.* (starke Bindung der CaMKII $\alpha$  an den Shank3-N-Terminus) bestätigt wurden (Abbildung 15a). Zusätzlich zu den neuen *missense*-Mutationen wurde in das Experiment auch die L68P-Mutation integriert, da wir vermuteten, dass diese Mutation aufgrund der Entfaltung der SPN-Domäne weniger stark an die CaMKII $\alpha$  bindet.

Tatsächlich wurde für die L68P-Variante eine signifikant verringerte Interaktion festgestellt, sodass die Relevanz der SPN-Domäne für eine Bindung an die CaMKII $\alpha$  untermauert werden konnte (Abbildung 15b). Neben L68P führten auch die Mutationen Q106P und P141A zu einer signifikant beeinträchtigten Bindung an die CaMKII $\alpha$ . Die verringerte Bindung der Q106P-Variante kann über die unmittelbare Nähe von Gln106 zur Linker-Region, die einen wesentlichen Teil der Bindungsstelle für die CaMKII $\alpha$  ausmacht, erklärt werden. Pro141 befindet sich dagegen in den Ankyrin-Wiederholungen im Bereich der Kontaktstelle zwischen SPN-Domäne und der Ank-Region. Wir vermuteten, dass die P141A-Mutation durch das Aufbrechen des SPN-Ank-Tandems zu einer beeinträchtigten Bindung an die CaMKII $\alpha$  führt. Durch die räumliche Separation von SPN- und Ank-Domäne könnte sich auch die Konformation der Linker-Region verändern, die in der geschlossenen Tandemstruktur wie ein Scharnier zwischen SPN-Domäne und den Ank-Wiederholungen zu wirken scheint.

Um die Hypothese, dass eine Öffnung der SPN-Ank-Konformation die CaMKII $\alpha$ -Bindung erheblich einschränkt, zu verifizieren, wurde zudem der Effekt der N52R-Mutation auf die CaMKII $\alpha$ -Interaktion untersucht. Da diese Mutation spezifisch darauf ausgerichtet war, das SPN-Ank-Tandem zu öffnen, eignete sich die N52R-Variante für die Validierung der Hypothese. In der Tat beobachtete ich, dass diese Mutation in der SPN-Ank-Schnittstelle zu einem nahezu vollständigen Verlust der CaMKII $\alpha$ -Bindung führte (Abbildung 15c+d), sodass die Annahme, dass die CaMKII $\alpha$  nicht (oder nur in sehr geringem Ausmaß) an die geöffnete Konformation des Shank3-N-Terminus bindet, bestätigt wurde.

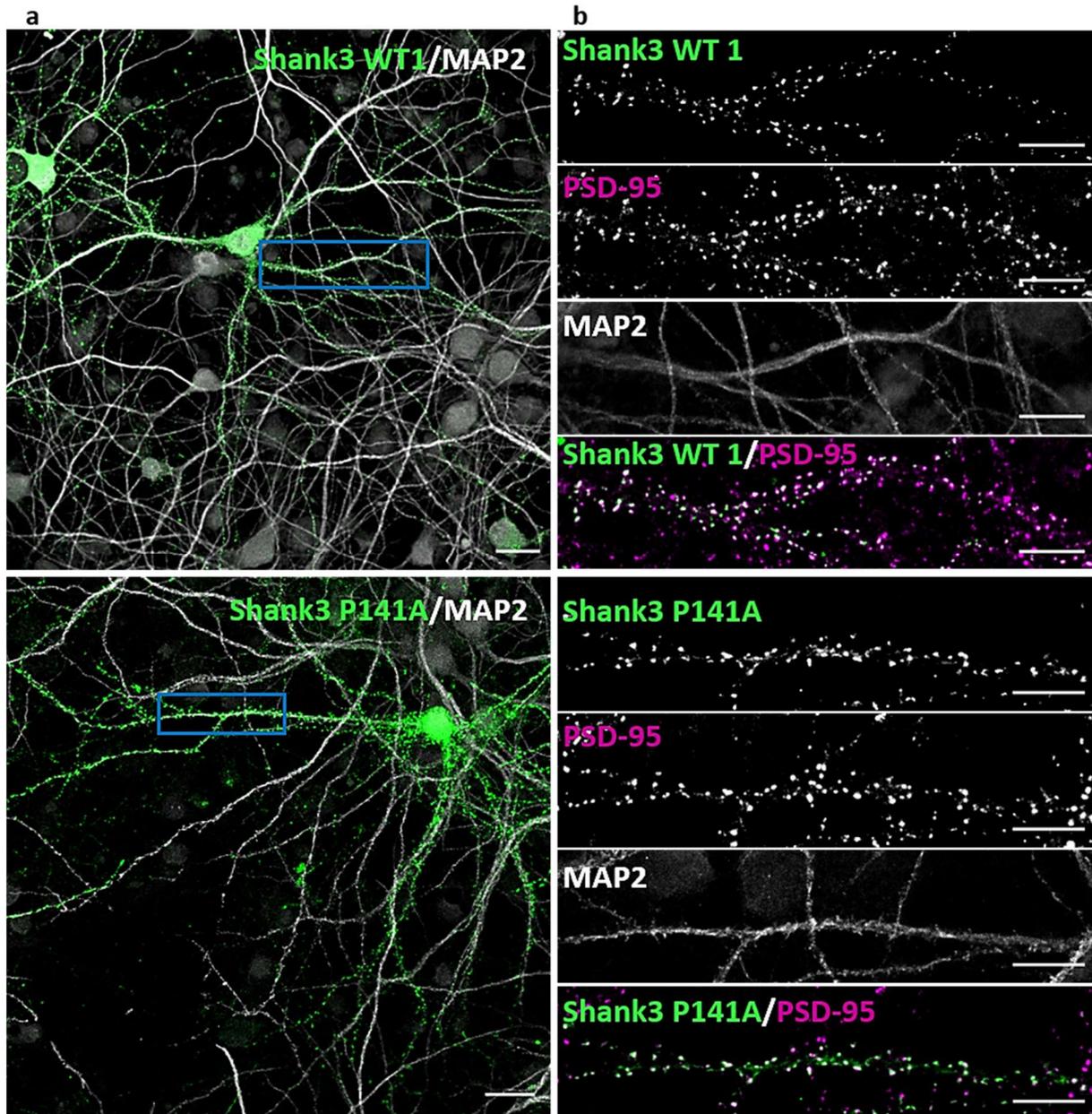


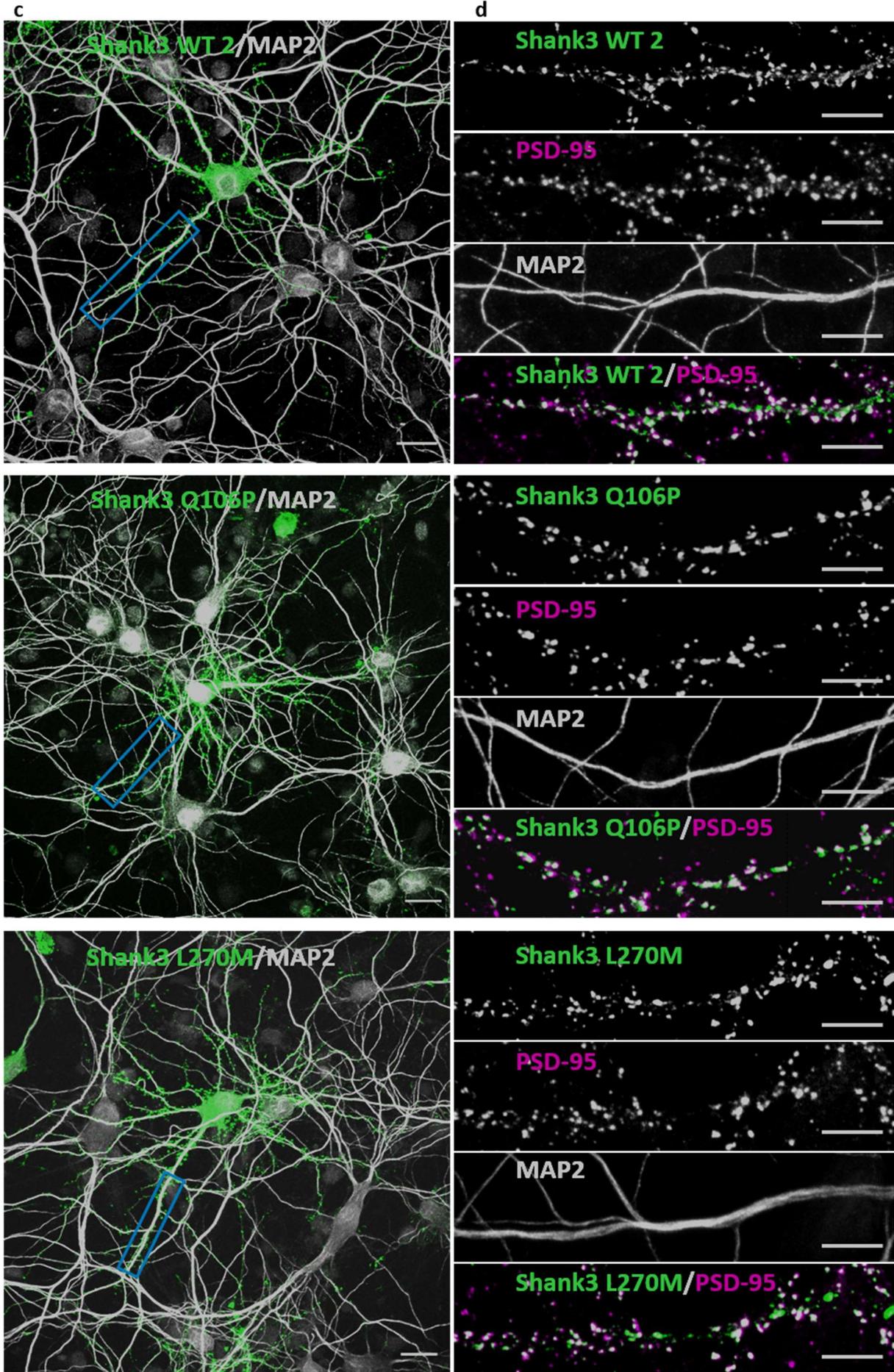
**Abbildung 15: Die Öffnung der N-terminalen Konformation von Shank3 beeinträchtigt die CaMKII $\alpha$ -Bindung.** (a) RFP-markierte Varianten des Shank3-N-Terminus (SPN + Ank), sowie RFP allein, wurden in 293T-Zellen mit der CaMKII $\alpha$  (T7-markiert) koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-trap-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert. (b) Quantitative Analyse der Daten aus (a). Die Signalintensitäten der CaMKII $\alpha$  wurden durch die Signalintensitäten der RFP-Shank3-Proteine geteilt. \*, \*\*\* Signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ; Daten aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test. (c+d) Der Assay aus (a) wurde für die N52R-Mutation wiederholt. \*\*\*\*, signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,0001$ ; Daten aus drei unabhängigen Experimenten; t-Test.

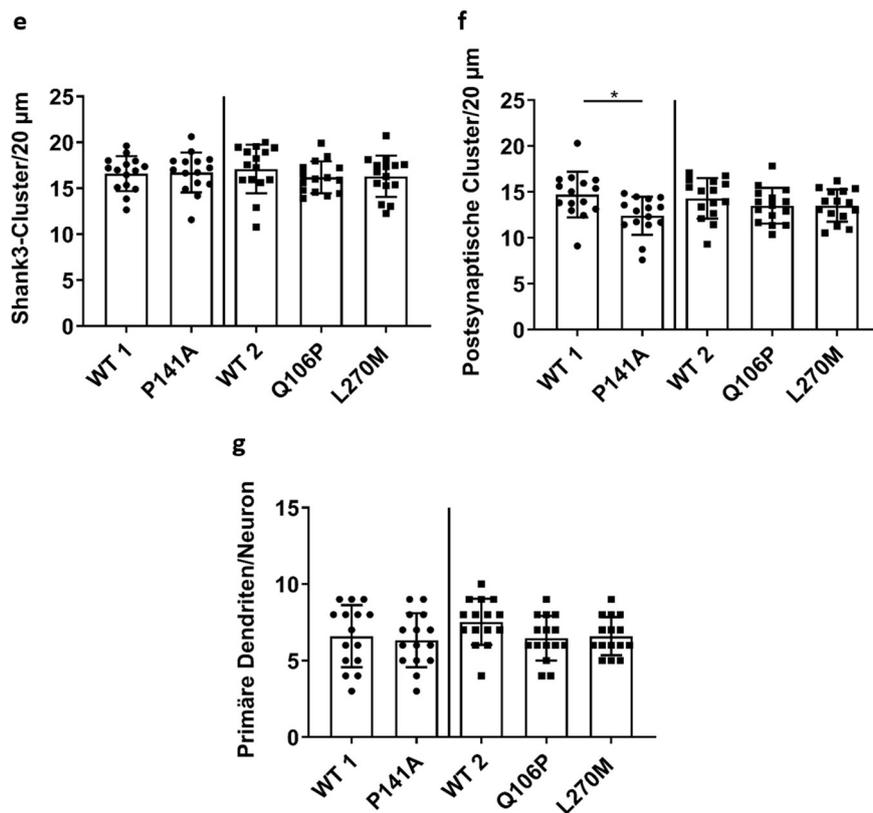
### 3.1.9 Die P141A-Mutation führt zu einer verringerten Dichte postsynaptischer Shank3-Cluster

Um die Relevanz der Ergebnisse der Interaktionsstudien mit den neuen *missense*-Varianten auch für die synaptische Funktion von Shank3 zu beleuchten, wurden primär kultivierte hippocampale Neuronen mit Expressionskonstrukten für GFP-markiertes Shank3 (Protein voller Länge; WT und Mutanten) transfiziert und hinsichtlich der Verteilung von MAP2 (dendritischer Marker), PSD-95 (postsynaptischer Marker) sowie GFP-Shank3 mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 16a-d). Neben der P141A-Mutation (Abbildung 16a+b), die nicht nur die Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern signifikant verändert, sondern auch den intramolekularen SPN-Ank-Kontakt aufbricht, wurden die Mutationen Q106P und L270M für diese Analyse ausgewählt (Abbildung 16c+d). Die Q106P-Mutation führte zu einem Verlust der Bindung an den erst kürzlich identifizierten postsynaptischen Interaktionspartner – die CaMKII $\alpha$  – und sollte dementsprechend in Neuronen untersucht werden. Die L270M-Mutation wird mit einem neuartigen Phänotyp assoziiert (ADHS) und erschien ebenso interessant für eine fluorenzmikroskopische Analyse.

Sowohl der WT als auch die Mutanten-Proteine wurden in dendritischen Clustern gefunden, die mehrheitlich PSD-95 kolokalisierten. Diese PSD-95-positiven Shank3-Cluster, die als postsynaptische Cluster bezeichnet werden können, ordneten sich überwiegend um den dendritischen Schaft (MAP2-markiert) herum an, was auf eine Lokalisation in dendritischen Dornen hinweist. Während die Anzahl der Shank3-Cluster für keine Mutante klar vom WT abwich (Abbildung 16e), konnte für die P141A-Variante eine signifikant verringerte Dichte an postsynaptischen Shank3-Clustern festgestellt werden (Abbildung 16f). Für Q106P und L270M konnte dieser Unterschied nicht beobachtet werden. Darüber hinaus wirkte sich keine der Mutationen auf die neuronale Morphologie aus, da für keine Mutante eine Änderung im Hinblick auf die Anzahl der primären Dendriten gefunden werden konnte.







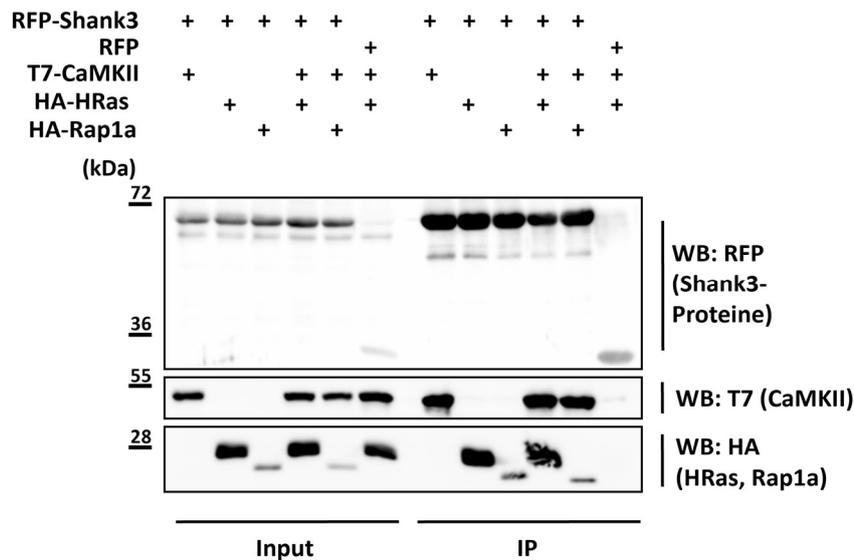
**Abbildung 16: Die P141A-Mutation beeinträchtigt die Bildung postsynaptischer Cluster.** Primäre hippocampale Neuronen wurden mit Expressionsvektoren für GFP-Shank3 (WT, P141, Q106P, L270M) transfiziert und hinsichtlich PSD-95 (magenta) und MAP2 (grau) im Fluoreszenzmikroskop analysiert. (a + c) Transfizierte Neuronen in der Übersicht (Skalierungsbalken 20 μm). (b + c) Die in (a) und (c) jeweils blau eingerahmten dendritischen Abschnitte wurden vergrößert dargestellt (Skalierungsbalken 5 μm). GFP-Shank3 kolokalisiert ausgiebig mit PSD-95 in postsynaptischen Clustern. (e) Quantifizierung der Anzahl der GFP-Shank3-Cluster pro 20 μm Dendrit. Nicht signifikant abweichend von WT; Analyse von 45 dendritischen Abschnitten von n = 15 Neuronen aus drei verschiedenen unabhängigen Experimenten; t-Test (Vgl. WT1 mit P141A) bzw. ANOVA (Vgl. WT2 mit Q106P und L270M). (f) Quantifizierung der Anzahl der postsynaptischen Shank3-Cluster (Shank3-Cluster positiv für PSD-95) pro 20 μm Dendrit. \*, signifikant abweichend vom WT,  $p > 0,05$ ; Analyse von 45 dendritischen Abschnitten von n = 15 Neuronen aus drei unabhängigen Experimenten; t-Test (Vgl. WT1 mit P141A) bzw. ANOVA (Vgl. WT2 mit Q106P und L270M). (g) Quantifizierung der Anzahl primärer Dendriten pro Neuron. Nicht signifikant abweichend vom WT; Analyse von n = 15 Neuronen aus drei unabhängigen Experimenten; t-Test (Vgl. WT1 mit P141A) bzw. ANOVA (Vgl. WT2 mit Q106P und L270M). Da die Neuronen, die mit Q106P bzw. L270M transfiziert worden waren, aus unterschiedlichen Primärkulturen stammten wie die P141A-transfizierten Neuronen, wurden diese Mutationen separat voneinander quantifiziert. Die Bilder für die P141A-Mutante sowie WT1 wurden von Debora Tibbe aufgenommen und durch den Autoren dieser Arbeit ausgewertet.

## 3.2 Untersuchung der Shank3-CaMKII $\alpha$ -Interaktion *in vitro* und *in vivo*

### 3.2.1 Die CaMKII $\alpha$ kompetiert in 293T-Zellen nicht mit HRas/Rap1a um Bindung an den Shank3-N-Terminus

Sowohl die CaMKII $\alpha$  als auch die kleinen G-Proteine HRas und Rap1a werden als Schlüsselkomponenten der postsynaptischen Signaltransduktion angesehen. Die CaMKII $\alpha$  bindet in ihrer inaktiven, nicht-phosphorylierten Form ebenso wie die beiden G-Proteine in deren jeweils aktiven, GTP-beladenen Form an den Shank3-N-Terminus. Basierend auf zwei Publikationen der Arbeitsgruppe von M. Zhang (Hongkong, China) überlappen die Bindungsstellen dabei stellenweise (Cai *et al.*, 2020a, 2020b). Diese Proteine binden an die SPN-Domäne, wobei dem Aminosäurerest R12

in der Oberfläche der SPN-Domäne jeweils eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Bindung zugesprochen wird. Die zu einem autistischen Phänotyp führende *missense*-Mutation R12C resultiert jeweils in einem Verlust der Bindung an die CaMKII $\alpha$  sowie HRas/Rap1a. Um die Hypothese zu verifizieren, dass die CaMKII $\alpha$  mit HRas und/oder Rap1a um die Bindung an die SPN-Domäne kompetiert, wurde ein Ko-IP-Experiment in 293T-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden die T7-markierte CaMKII $\alpha$  zusammen mit HA-markiertem HRas/Rap1a koexprimiert und die jeweilige Bindung an den RFP-markierten Shank3-N-Terminus wurde untersucht (Abbildung 17). Interessanterweise konnte keine Konkurrenz um die Shank3-Bindung festgestellt werden; in Anwesenheit der CaMKII $\alpha$  banden



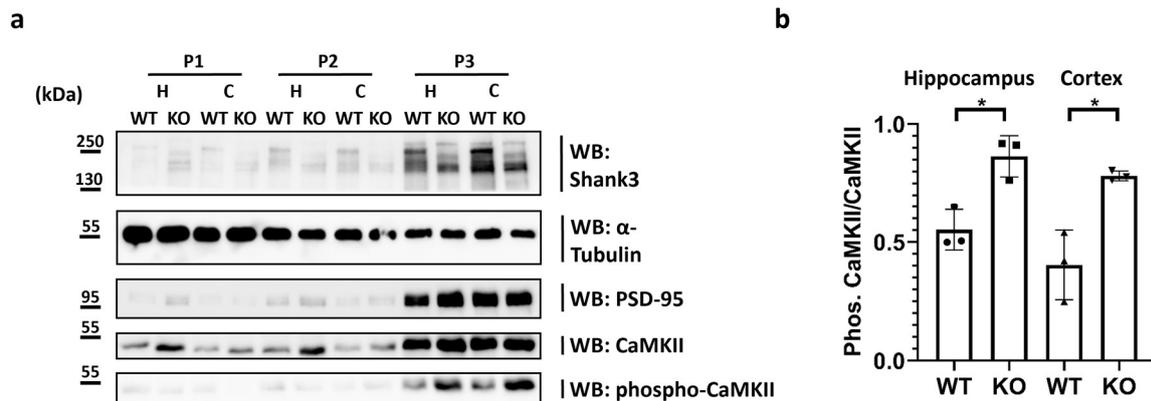
**Abbildung 17: Die CaMKII $\alpha$  kompetiert nicht mit HRas oder Rap1a um die Bindung an die SPN-Domäne.** RFP-markierter Shank3-N-Terminus (SPN + Ank) wurde in 293T-Zellen zusammen mit T7-markierter CaMKII $\alpha$  und HA-markiertem HRas/Rap1a koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-trap-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert.

HRas und Rap1a jeweils effektiv an den Shank3-N-Terminus.

### 3.2.2 Ein *Shank3*-KO resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung der CaMKII $\alpha$

Meine Ergebnisse, dass mehrere *SHANK3*-missense-Mutationen (L68P, Q106 und P141A) die Bindung des Shank3-N-Terminus an die unphosphorylierte (und somit inaktive) Form der CaMKII $\alpha$  beeinträchtigen, führte mich zu der Frage, welche Bedeutung diese Interaktion *in vivo* einnimmt. Um die Hypothese, dass Shank3 über die Bindung an die Kinase deren Aktivierung reguliert, zu verifizieren, arbeitete ich mit einer KO-Mauslinie (*Shank3* $\alpha\beta$ -defiziente Mäuse), in der Shank3-Isoformen, die den N-terminalen Bereich des Proteins (SPN + Ank) beinhalten, fehlen. Es wurde die postsynaptische Dichte (PSD) sowohl aus dem Cortex als auch aus dem Hippocampus von WT- und *Shank3*-KO-Mäusen isoliert, da in diesen Hirnregionen *SHANK3* am stärksten exprimiert wird, und anschließend mittels Western Blot der Phosphorylierungsstatus der CaMKII $\alpha$  untersucht (Abbildung 18). In den Proben der *Shank3*-KO-Mäuse konnte keine Bande für das vollständige Protein (ca. 250 kDa) detektiert werden, sodass der *knockout* der längeren Isoformen verifiziert wurde (Abbildung 18a). Im Gegensatz zu der allgemeinen Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin, die in der postnukleären Fraktion, der Membranfraktion (P2) sowie in der PSD (P3) tendenziell gleichmäßig detektiert wurde, kam es für die postsynaptischen Proteine Shank3, PSD-95 (Ladekontrolle für die PSD) sowie für die CaMKII $\alpha$  zu einer Anreicherung in den PSD-Proben aus Hippocampus und Cortex. Interessanterweise ergab der Vergleich der PSD-Fractionen der WT- und KO-Mäuse, dass die *Shank3*-NT-Defizienz sowohl im Hippocampus als auch im Cortex in einer stärkeren Phosphorylierung (und damit Aktivierung) der CaMKII $\alpha$  resultierte (Abbildung

18b). Aus diesem Ergebnis konnte geschlussfolgert werden, dass Shank3 über den N-Terminus als negativer Regulator der CaMKII $\alpha$ -vermittelten Signalwege fungiert.



**Abbildung 18: Shank3 reguliert die Aktivierung der CaMKII $\alpha$  in der PSD.** (a) Sowohl aus WT- als auch aus *Shank3* $\alpha\beta$ -KO-Mäusen wurde die postnukleäre Fraktion (P1), die Membranfraktion (P2) sowie die PSD-Fraktion (P3) aus dem Hippocampus und Cortex isoliert und mittels Western Blot analysiert. (b) Die Menge an phosphorylierter CaMKII $\alpha$  in der PSD wurde durch die Gesamtmenge an CaMKII $\alpha$  in der PSD dividiert. \*, signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,05$ ; Daten aus drei unabhängigen Experimenten (für jedes einzelne Experiment wurden Hippocampi und Cortices aus jeweils fünf WT- und KO-Mäuse verwendet); t-Test.

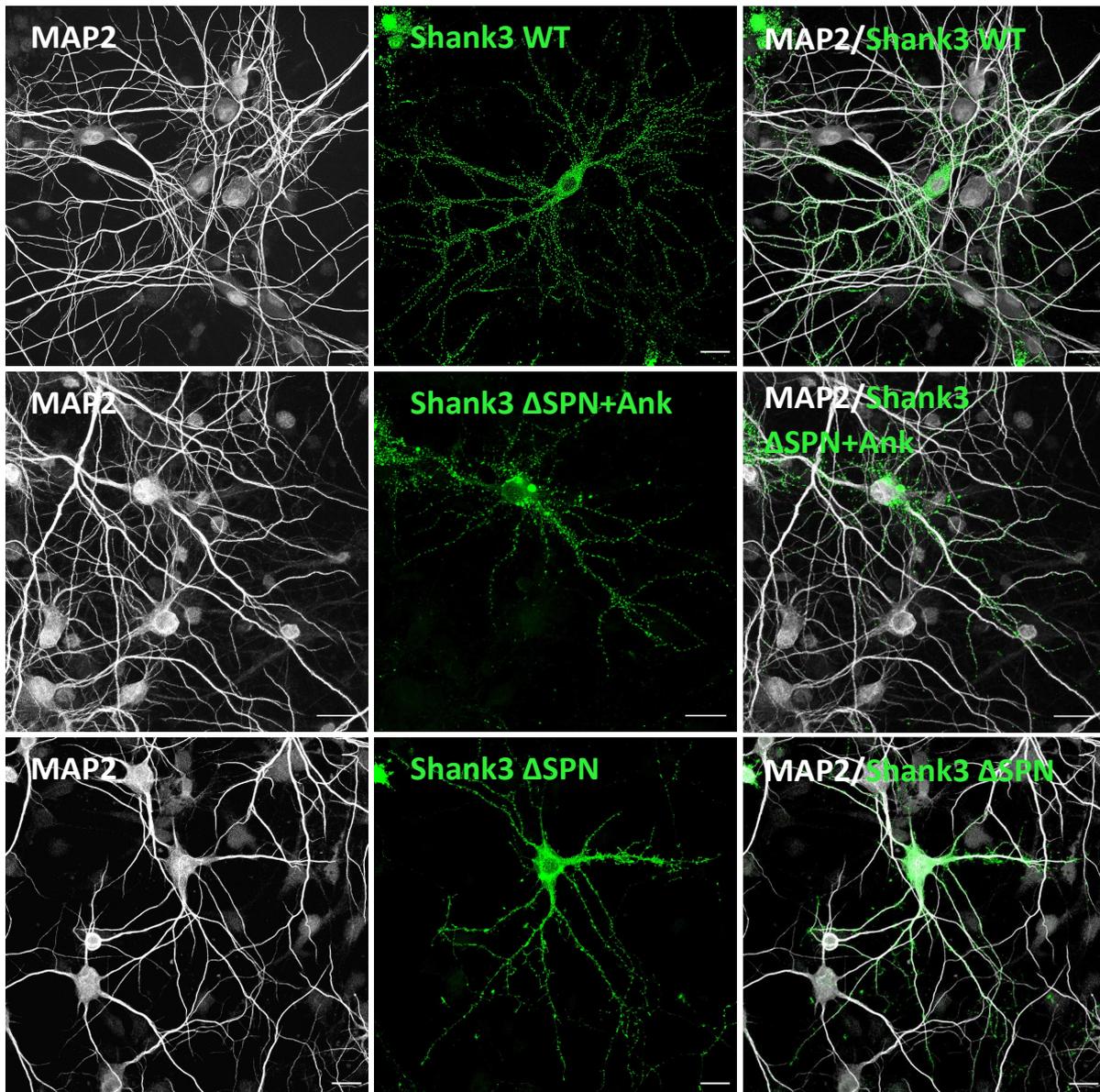
### 3.3 Analyse der Shank3-Clusterbildung in hippocampalen Neuronen und HEK293T-Zellen

In meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass die P141A-Mutation, welche die SPN-Ank-Tandemstruktur öffnet, die Fähigkeit von Shank3, in Neuronen postsynaptische Cluster zu bilden, herabsetzt. Dieses Ergebnis führte mich zu der Frage nach der physiologischen Funktion der SPN-Ank-Faltung. Um näher zu untersuchen, welche Bedeutung die Blockade der Ankyrin-Wiederholungen durch die SPN-Domäne für die synaptische Funktion von Shank3 besitzt, wurde ein GFP-Shank3-Konstrukt ohne SPN-Domäne ( $\Delta$ SPN-Konstrukt) generiert.

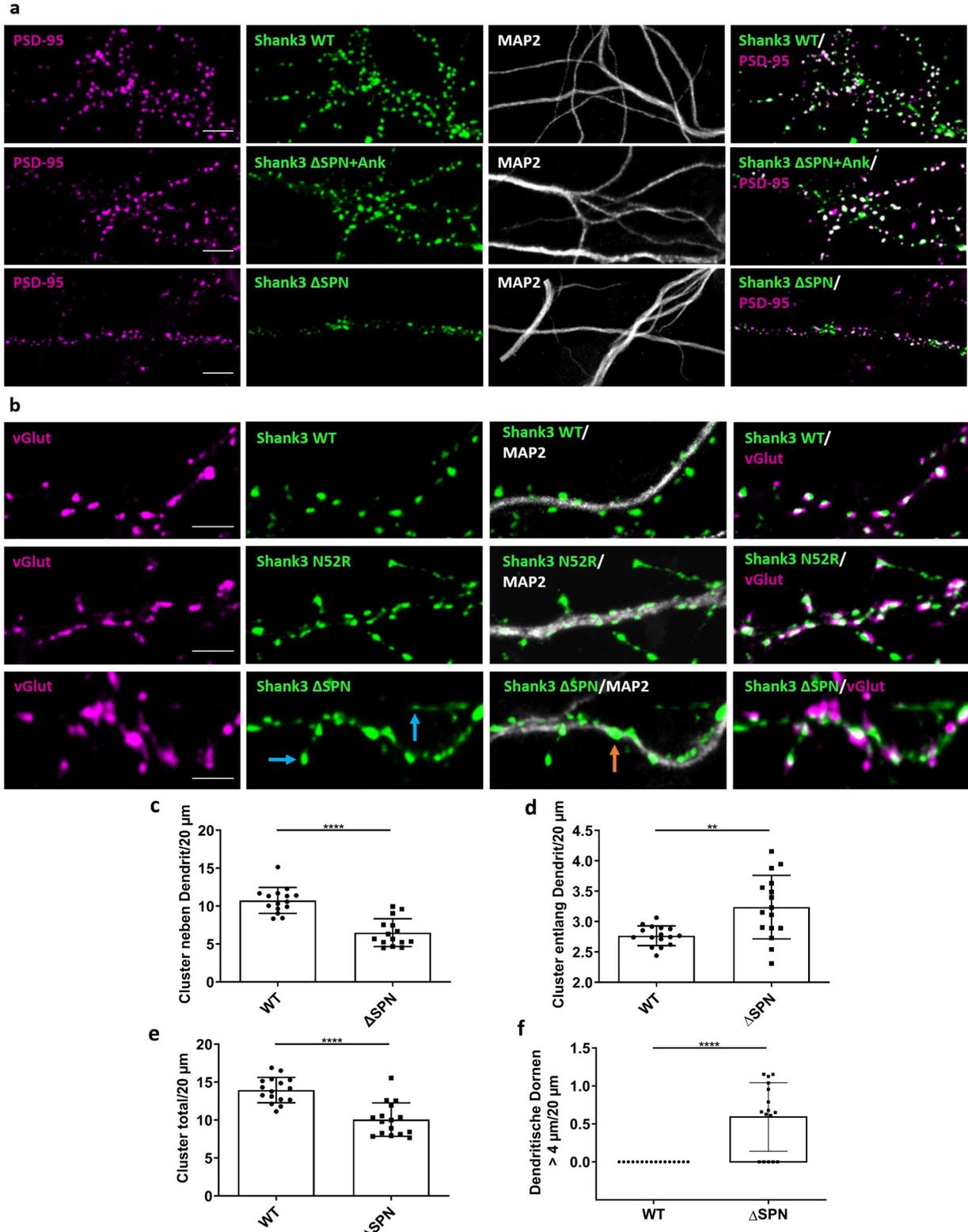
#### 3.3.1 Das $\Delta$ SPN-Konstrukt zeigt einen drastisch veränderten Phänotyp in hippocampalen Neuronen

Um die Auswirkungen der Deletion der SPN-Domäne für die synaptische Funktion von Shank3 zu analysieren, wurde das GFP- $\Delta$ SPN-Konstrukt in hippocampalen Neuronen exprimiert. Zum Vergleich wurden Neuronen mit dem vollständigen GFP-Shank3-WT-Konstrukt sowie mit einem GFP-Shank3-Konstrukt ohne den gesamten N-Terminus ( $\Delta$ SPN+Ank) transfiziert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der transfizierten Neuronen zeigte einen im Vergleich zum WT erheblich veränderten Phänotyp für das  $\Delta$ SPN-Konstrukt (Abbildung 19). Während für den WT viele Shank3-Cluster um die Dendriten herum zu beobachten waren, was auf eine postsynaptische Lokalisation von Shank3 in dendritischen Dornen hinweist, ergab sich für das  $\Delta$ SPN-Konstrukt ein weitaus diffuser verteiltes, weniger geclustertes GFP-Signal in den Neuronen. Interessanterweise konnte dieser Effekt nicht für das  $\Delta$ SPN+Ank-Konstrukt festgestellt werden; dieses Konstrukt führte analog zum WT zu einer synaptischen Lokalisation des verkürzten Shank3-Proteins. Für das WT- sowie das  $\Delta$ SPN-Ank-Protein konnte eine extensive Kolo-kalisation der Shank3-Cluster mit den PSD-95-Clustern beobachtet werden (Abbildung 20a). Postsynaptische Cluster konnten zwar auch für das  $\Delta$ SPN-Konstrukt detektiert werden, allerdings bildeten sich die Shank3-Cluster hierbei weniger häufig um die Dendriten herum, sondern verstärkt entlang des dendritischen Schafts (Abbildung 20c+d). Insgesamt resultierte die Deletion der SPN-Domäne in einer verringerten Dichte an Shank3-Clustern (Abbildung 20e). Da der

$\Delta$ SPN-Phänotyp an die Auswirkungen der N52R-Mutation (führt zur Öffnung des SPN-Ank-Tandems, (Salomaa *et al.*, 2021)) in Neuronen erinnerte, wurde auch diese Variante exprimiert und mikroskopisch analysiert (Abbildung 20b). Tatsächlich führte das  $\Delta$ SPN-Konstrukt ebenso wie die N52R-Variante verstärkt zur Shank3-Cluster-Bildung entlang des dendritischen Schafts sowie zur Ausprägung von deformierten, äußerst langen dendritischen Dornen ( $> 4 \mu\text{m}$ ), die für den WT nicht beobachtet werden konnten (Abbildung 20f). Interessanterweise waren die Shank-Cluster der  $\Delta$ SPN- bzw. N52R-exprimierenden Neuronen trotz der abnormalen Morphologie jeweils positiv für den vesikulären Glutamattransporter (vGlut), der als präsynaptischer Marker verwendet wurde. Somit erschien die generelle Ausbildung synaptischer Kontakte nicht beeinträchtigt zu sein, allerdings führte die Deletion der SPN-Domäne (analog zur N52R-Mutation) zu einer Lokalisation der Synapsen am dendritischen Schaft und zu einer vom WT abweichenden Morphologie der dendritischen Dornen.



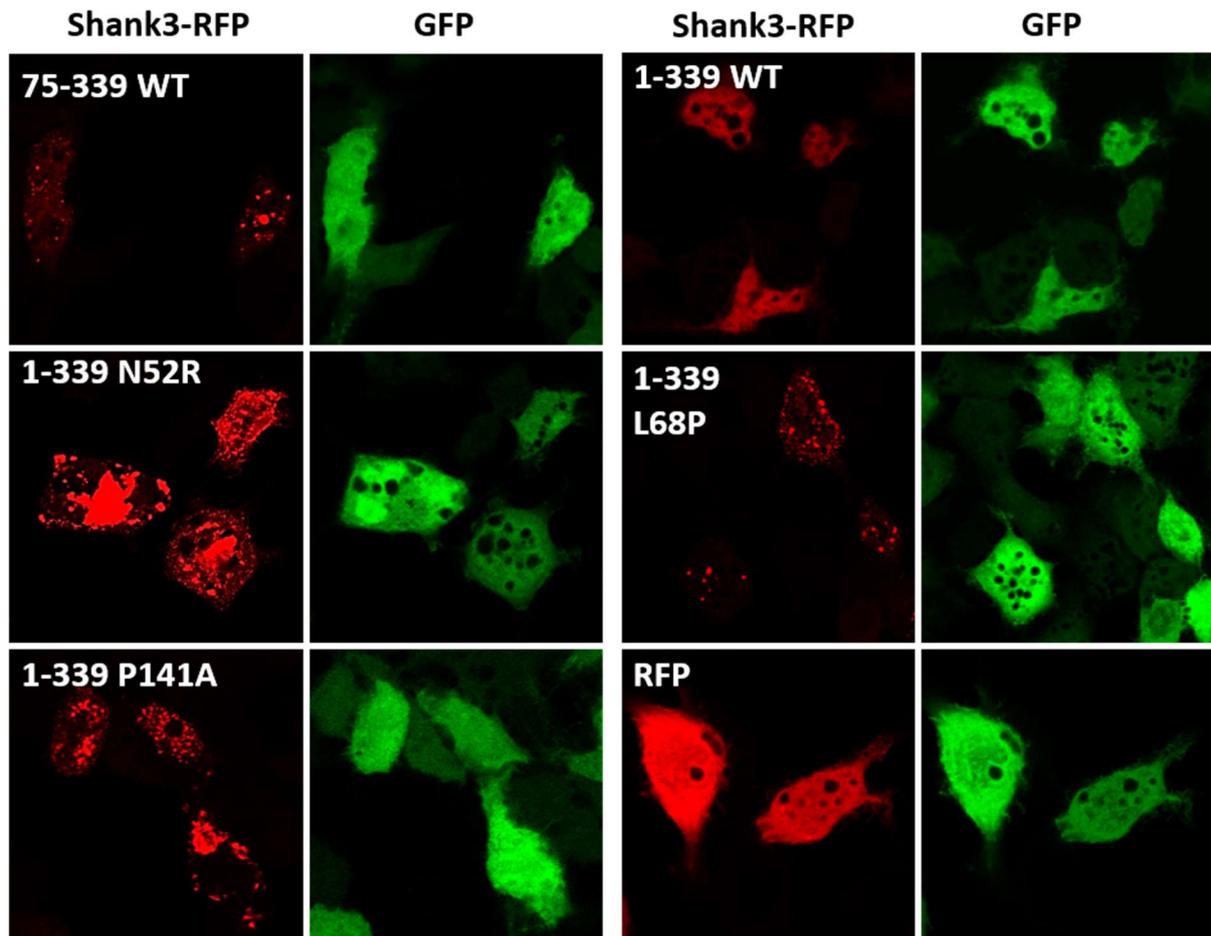
**Abbildung 19: Das  $\Delta$ SPN-Konstrukt zeigt einen erheblich veränderten Phänotyp in Neuronen.** Primäre hippocampale Neuronen wurden mit GFP-Shank3 (WT,  $\Delta$ SPN+Ank,  $\Delta$ SPN) transfiziert und hinsichtlich MAP2 (grau) im Fluoreszenzmikroskop analysiert (transfizierte Neuronen in der Übersicht; Skalierungsbalken  $20 \mu\text{m}$ ).



**Abbildung 20: Die Deletion der SPN-Domäne verändert die Lokalisation sowie die Morphologie der dendritischen Dornen von Shank3.** Hippocampale Neuronen wurden mit GFP-Shank3 ((a) WT, ΔSPN+Ank, ΔSPN; (b) WT, N52R, ΔSPN) transfiziert und hinsichtlich MAP2 (grau) und PSD-95 (magenta) bzw. vGluT (magenta) mikroskopisch analysiert (dendr. Abschnitte; Skalierungsbalken 5 μm). (b) Der orangene Pfeil zeigt ein entlang des Dendriten gestrecktes SH3-Cluster an, während die blauen Pfeile zur Markierung äußerst langer dendr. Dornen verwendet wurden. (c-e) Quantifizierung der SH3-Cluster um den Dendriten herum (c), entlang des Dendriten (d) sowie Gesamtmenge der SH3-Cluster pro 20 μm. (f) Quantifizierung der Anzahl langer dendr. Dornen. \*\*,\*\*\*\*, signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,0001$ ; Analyse von 45 dendr. Abschnitten von  $n = 15$  Neuronen aus drei unabhängigen Experimenten; t-Test.

### 3.3.2 Freie Ankyrin-Wiederholungen bilden Proteincluster in 293T-Zellen

Basierend auf der Beobachtung, dass die Deletion der SPN-Domäne in Neuronen vermehrt zur vorzeitigen Shank3-Clusterbildung auf dem dendritischen Schaft führt, stellte ich die Hypothese auf, dass freie, nicht mehr von der SPN-Domäne blockierte Ank-Wiederholungen intermolekular interagieren und somit irreguläres Clustering bedingen könnten. Um zu untersuchen, ob freie Ank-Regionen im zellulären Kontext die Verteilung/Lokalisation des Shank3-N-Terminus beeinflussen, wurden RFP-markierte Konstrukte für den Shank3-N-Terminus (SPN + Ank) bzw. für die Ank-Wiederholungen zusammen mit GFP (Kontrolle) in 293T-Zellen koexprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 21).



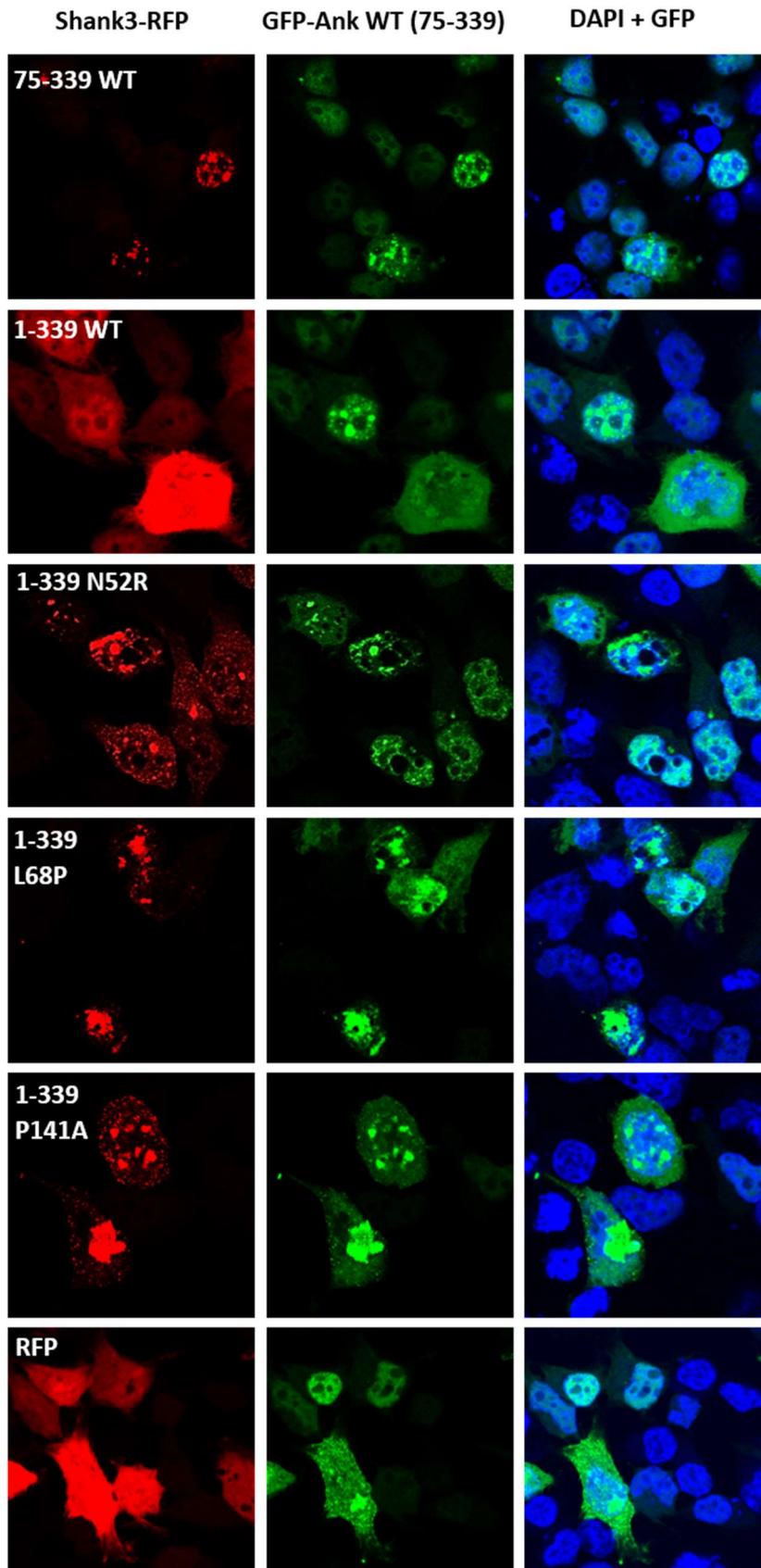
**Abbildung 21: Freie Ank-Wiederholungen bilden Clusterstrukturen in 293T-Zellen.** 293T-Zellen wurden mit verschiedenen RFP-Shank3-Konstrukten (1-339 WT und Mutanten; 75-339 WT), sowie mit RFP allein, zusammen mit GFP kotransfiziert.

Während sich der Shank3-N-Terminus analog zur RFP-Kontrolle in der ganzen Zelle gleichmäßig verteilt (diffuses Signal), befanden sich die freien Ankyrin-Fragmente in kleinen, vorwiegend runden Clustern innerhalb der HEK-Zellen. Interessanterweise führten auch drei *missense*-Mutationen, die alle mit der SPN-Ank-Tandem-Faltung interferieren, zur Clusterbildung des Shank3-N-Terminus, wobei Größe und Form der Proteincluster dabei stark variierte.

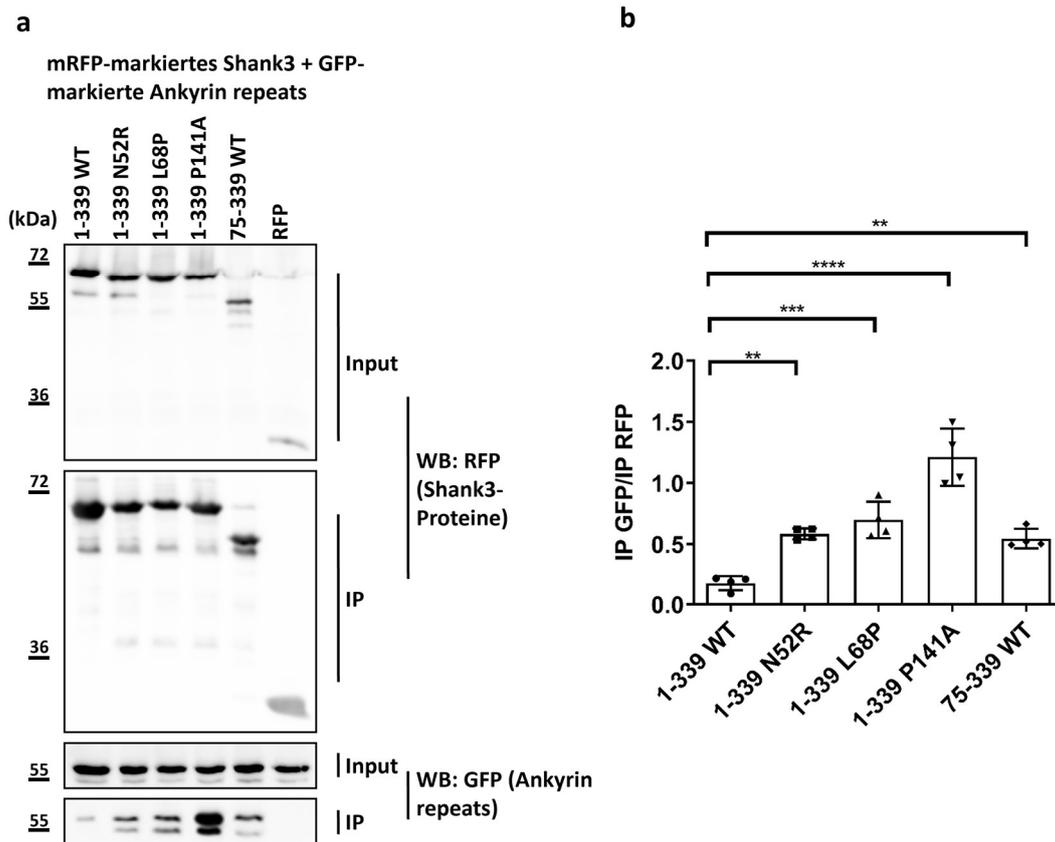
Um den Einfluss einer möglichen Ank-Ank-Interaktion zu visualisieren, wurden die RFP-Shank3-Proteinfragmente zusammen mit einem GFP-Ank-Fragment in 293T-Zellen produziert und mikroskopisch untersucht (Abbildung 22). Während das GFP-Ank-Protein in 293T-Zellen in Clusterstrukturen zu finden war, verteilte sich der Shank3-N-Terminus WT auch in Anwesenheit eines überexprimierten GFP-Ank-Konstruktes diffus in den Zellen. Dahingegen kolokalisierten RFP- und GFP-Ank ausgesprochen stark in überwiegend distinkten Proteinclustern. Eine vergleichbar starke Kolokalisierung mit den freien Ankyrin-Wiederholungen konnte auch für die P141A-Variante des Shank3-N-Terminus beobachtet werden. Auch die *missense*-Mutationen N52R und L68P führten dazu, dass der Shank3-N-Terminus zusammen mit den freien Ank-Wiederholungen verstärkt in Proteinclustern (verteilt innerhalb der Zellen) kolokalisierte, wobei insbesondere im Zuge der Koexpression von N52R- und GFP-Ank-Konstrukt auch Cluster detektiert wurden, die nur positiv für entweder RFP oder GFP waren. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass N-terminale (SPN + Ank) *missense*-Varianten, die über eine Öffnung des SPN-Ank-Tandems (N52R, P141A) oder durch eine Entfaltung der SPN-Domäne (L68P) über eine freigelegte Ank-Region verfügen, gemeinsam mit freien Ankyrin-Fragmenten in Clusterstrukturen aggregierten, während der N-Terminus in seiner geschlossenen Konformation keine Proteincluster in 293T-Zellen bildete.

### 3.3.3 Die SPN-Domäne blockiert Ank-Ank-Interaktionen

Um die Annahme zu bestätigen, dass freie Ankyrin-Wiederholungen miteinander interagieren und somit zur Clusterbildung in HEK293T-Zellen beitragen, wurde ein Ko-IP-Experiment (*RFP-trap*) in 293T-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden RFP-markierte Konstrukte für den Shank3-N-Terminus (SPN + Ank; WT und Mutanten) bzw. für das Ank-Fragment zusammen mit dem GFP-Ank-Konstrukt in 293T-Zellen koexprimiert. Tatsächlich konnte für freie Ankyrin-Fragmente eine intermolekulare Interaktion festgestellt werden (Abbildung 23a+b). Zwar kam es auch zu einer leichten Ko-Präzipitation der freien Ank-Domäne in Anwesenheit des gesamten Shank3-N-Terminus, allerdings war diese Bindung signifikant schwächer als die Interaktion zwischen zwei freien Ank-Fragmenten. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die SPN-Domäne über die intramolekularen Interaktionen mit der Ank-Region die Ank-Ank-Bindung blockiert. Darüber hinaus führten auch die getesteten *missense*-Mutationen (N52R, L68P, P141A), die mit den SPN-Ank-Wechselwirkungen interferieren, zu einer im Vergleich zum WT signifikant erhöhten Ko-Präzipitation der freien Ank-Domäne, sodass angenommen werden konnte, dass in diesen Fällen die Bindung über die freigelegte Ank-Region des N-terminalen Fragmentes erfolgt. Hierbei führte die P141A-Variante zu der eindeutig stärksten Ko-Präzipitation des freien Ank-Konstruktes, was dadurch erklärt werden kann, dass die P141A-Mutation zwar zu einer Öffnung der N-terminalen Tandemstruktur führt, aber die SPN-Domäne im Gegensatz zu den beiden anderen Varianten (N52R und L68P) nicht durch die Mutation beeinträchtigt wird. Voraussichtlich bindet die P141A-Variante freie Ank-Fragmente sowohl über Ank-Ank-Interaktionen als auch über die freigelegte SPN-Domäne.



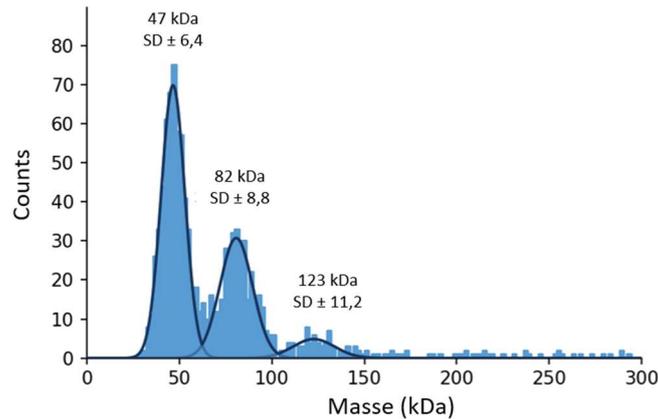
**Abbildung 22: Freie Ank-Wiederholungen koclustern in 293T-Zellen.** 293T-Zellen wurden mit einem GFP-Ank-Plasmid zusammen mit verschiedenen RFP-Shank3-Konstrukten (1-339 WT und Mutanten; 75-339 WT), sowie mit RFP allein, kotransfiziert. Die Zellkerne der 293T-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt.



**Abbildung 23: Die SPN-Domäne verhindert intermolekulare Ank-Ank-Interaktionen.** (a) RFP-markierte Varianten des Shank3-N-Terminus (SPN + Ank 1-339; Ank allein 75-339), sowie RFP als Kontrolle, wurden in 293T-Zellen mit einem GFP-Ank-Konstrukt (Aminosäuren 75-339) koexprimiert. Die RFP-markierten Proteine wurden mittels RFP-*trap*-Matrix immunpräzipitiert und die Input- und IP-Proben wurden via WB analysiert. (b) Quantitative Analyse der Daten aus (a). Die Signalintensitäten des GFP-Ank-Fragmentes wurden durch die Signalintensitäten der RFP-Shank3-Proteine geteilt. \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* Signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$ ; Daten aus vier unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

### 3.3.4 Die Ankyrin-Wiederholungen polymerisieren nicht in einer *in vitro*-Umgebung

Ausgehend von der in 293T-Zellen nachgewiesenen intermolekularen Ank-Ank-Interaktion wurde spekuliert, dass unkontrollierte Ank-Polymerisierung in Neuronen mit der regulären Synapsenbildung interferiert und zu vorzeitiger Shank3-Clusterbildung entlang des dendritischen Schafts der Nervenzellen führt. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde eine mögliche Ank-Polymerisierung *in vitro* initial mittels Massen-Photometrie (Kooperation mit dem CSSB, Hamburg) untersucht. Massen-Photometrie ermöglicht es, Proteine als einzelne Moleküle im nativen Zustand in Lösung zu analysieren. Hierbei werden die Proteine auf einer Messoberfläche (Deckgläschen) einem Lichtstrahl ausgesetzt. Massen-Photometrie misst die Interferenz zwischen dem durch ein Molekül gestreuten Licht und dem durch die Messoberfläche reflektierten Licht. Das gemessene Signal – der massenphotometrische Kontrast – korreliert direkt mit der molekularen Masse des untersuchten Biomoleküls, sodass die Multimerisierung von Proteinen analysiert werden kann. Für die massenphotometrische Messung wurde ein His-SUMO-Ank-Proteinfragment eingesetzt. Neben dem Peak für das Ank-Monomer (theoretisches Molekulargewicht: 41 kDa) konnte ein weiterer Peak mit einem gemittelten Molekulargewicht von  $82 \pm 8,8$  kDa detektiert werden, wobei es sich um eine Ank-Dimerstruktur handeln könnte, allerdings konnte kein Anzeichen für eine erweiterte Polymerisierung/Aggregation des His-SUMO-Ank-Fusionsproteins gefunden werden (Abbildung 24).



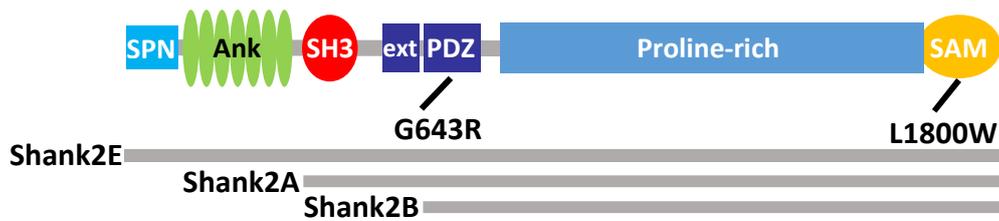
**Abbildung 24: Analyse der Ank-Multimerisierung *in vitro* mittels Massen-Photometrie.** Für die identifizierten Peaks wurde die gemessene (gemittelte) molare Masse mit Standardabweichung in das Histogramm (blau) eingetragen.

### 3.4 Funktionelle Charakterisierung neuer *SHANK2*-*missense* Mutationen in hippocampalen Neuronen

#### 3.4.1 *Missense*-Mutationen in *SHANK2* führen zu schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörungen

Mit Hilfe von Exom-Sequenzierung konnten am Institut für Humangenetik des UKE (Hamburg) sowie im DNA-Testlabor PreventionGenetics (Wisconsin, USA) zwei heterozygote *SHANK2*-*missense*-Mutationen (G643R; L1800W) in Patienten mit neurologischen Entwicklungsstörungen identifiziert werden. Beide *de novo missense*-Mutationen waren in Schlüsseldomänen von Shank2 lokalisiert: Die *missense*-Mutation G643R betraf die PDZ-Domäne, L1800W die SAM-Domäne (Abbildung 25). Beide Varianten konnten nicht in der GnoMAD-Datenbank gefunden werden, sodass ausgeschlossen wurde, dass es sich jeweils um Polymorphismen im *SHANK2*-Gen handelt. Die G643R-Mutation führte bei einem 17-jährigen Jungen zu geistiger Behinderung, Autismus und Epilepsie, während die L1800W-Mutation in einem Phänotyp resultierte, der durch eine milde geistige Behinderung, Entwicklungsstörungen, Mikrozephalie, Verhaltensauffälligkeiten und ADHS gekennzeichnet war.

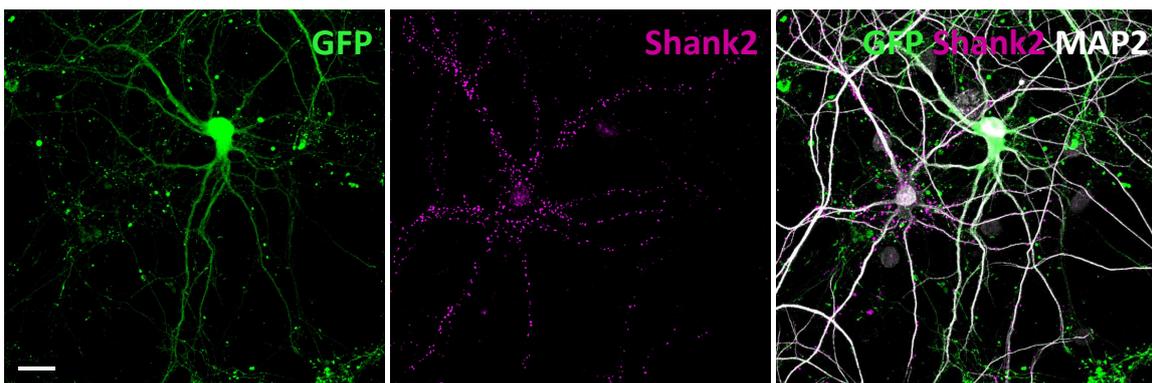
In der AG Kreienkamp konnte kürzlich bereits gezeigt werden, dass beide *missense*-Mutationen molekulare Interaktionen der jeweiligen Domänen beeinträchtigen. So führt die G643R-Mutation zu einem Verlust der Bindung der PDZ-Domäne von Shank2 an das postsynaptische Gerüstprotein GKAP. Die L1800W-Mutation interferiert hingegen mit der Bildung von Shank2-Oligomeren (die  $Zn^{2+}$ -abhängige Bildung von Homo-/Hetero-Oligomeren der Shank-SAM-Domänen gilt als essentiell für die reguläre Ausbildung der postsynaptischen Dichte). Mittels *in vitro*-Polymerisierungsassays konnte festgestellt werden, dass die L1800W-Variante die  $Zn^{2+}$ -abhängige Oligomerisierung der Shank2-SAM-Domäne signifikant verzögert. Zudem wurden für beide Mutationen Auswirkungen auf das postsynaptische *targeting* von Shank2 ausgemacht: Beide mutierten Varianten waren in hippocampalen Neuronen verglichen mit dem WT im Verhältnis verstärkt auf dem dendritischen Schaft und weniger stark in dendritischen Dornen lokalisiert. Allerdings blieb unklar, inwiefern die *missense*-Mutationen die generelle neuronale Morphologie beeinflussen und inwiefern eine Erhöhung der  $Zn^{2+}$ -Konzentration sich auf das postsynaptische *targeting* insbesondere der L1800W-Variante auswirkt. Für die erweiterte funktionelle Charakterisierung der *missense*-Varianten in Neuronen wurde dabei die längste neuronale *SHANK2*-Transkriptvariante 2A verwendet (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Domänenstruktur von Shank2.** Die Positionen der untersuchten Mutationen sind eingezeichnet. Die neuronalen Transkriptvarianten 2A (beginnend mit der SH3-Domäne; enthält eine N-terminal verlängerte (*extended*) PDZ-Domäne) und 2B (beginnend mit der PDZ-Domäne) werden ausschließlich im Gehirn exprimiert.

### 3.4.2 Erfolgreicher *knockdown* des *Shank2*-Gens in hippocampalen Neuronen

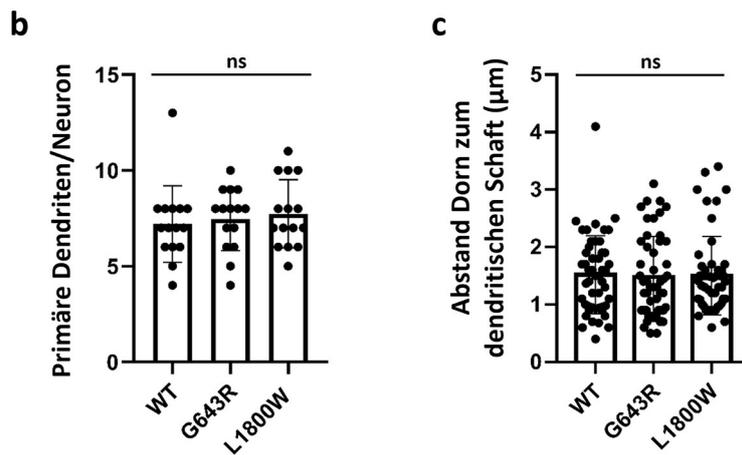
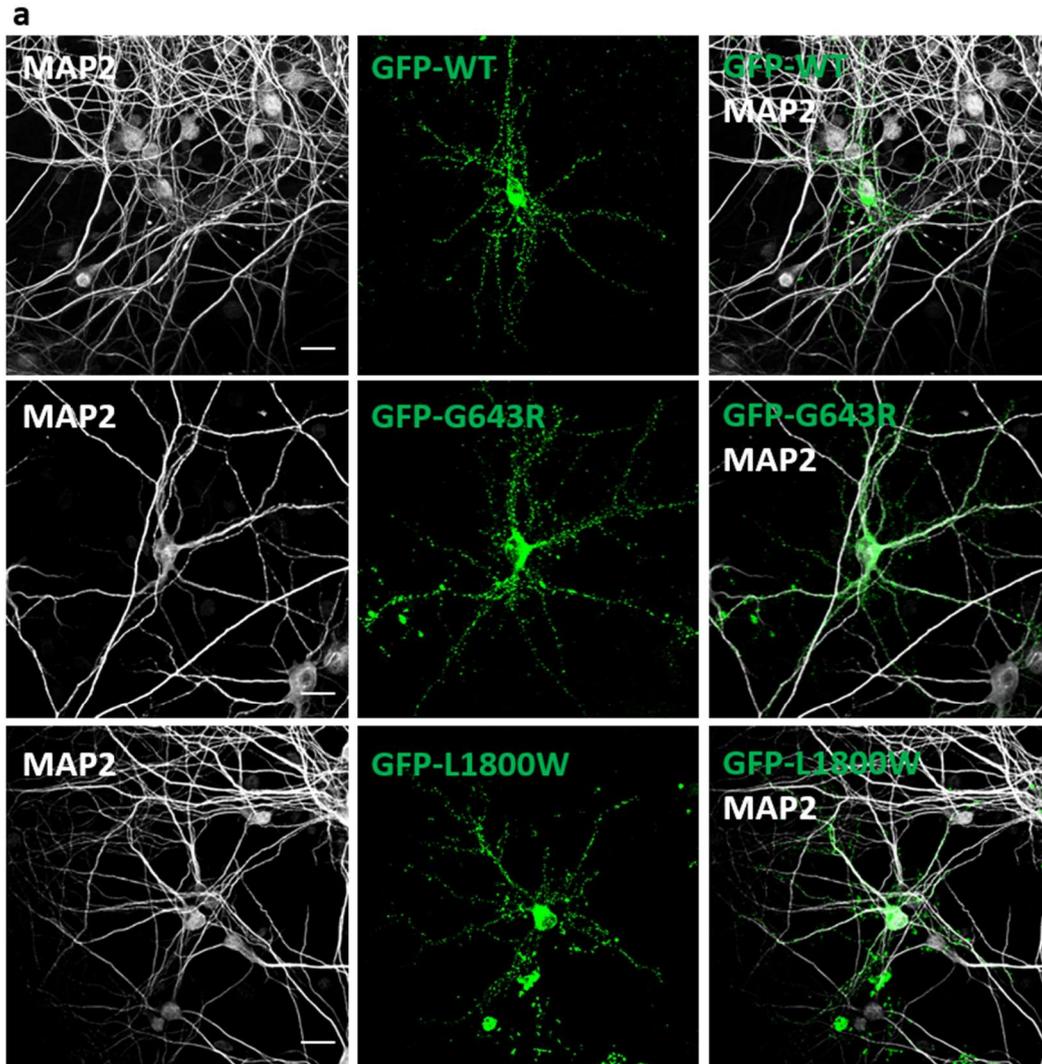
Um die Effekte der beiden *missense*-Mutationen in hippocampalen Rattenneuronen möglichst isoliert zu betrachten, wurde jeweils ein *Shank2*-shRNA-Konstrukt eingesetzt, um die Expression des *Shank2*-Gens der Ratte herunterzuregulieren. Die für die Transfektion der Neuronen verwendeten GFP-markierten humanen *SHANK2*-Konstrukte waren von diesem *knockdown* aufgrund ausreichender Sequenzabweichung zum shRNA-Target nicht betroffen. Die Effizienz des durchgeführten *Shank2*-*knockdowns* wurde in Abbildung 26 visualisiert. Während nicht transfizierte Neuronen ein geclustertes *Shank2*-Signal zeigten, konnte in den mit der shRNA transfizierten Neuronen (zusätzlich mit GFP transfiziert) die endogene Expression von *Shank2* erfolgreich unterdrückt werden.



**Abbildung 26: Die Expression des endogenen *Shank2*-Gens wurde effizient mittels shRNA unterdrückt.** Primäre hippocampale Rattenneuronen wurden mit GFP und einem *Shank2*-shRNA-Konstrukt kotransfiziert und mit Antikörpern gegen *Shank2* (Magenta-Färbung) sowie gegen MAP2 (dendritischer Marker, grau) angefärbt. Die Neuronen wurden mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Skalierungsbalken: 20  $\mu$ m).

### 3.4.3 Die *SHANK2*-*missense*-Mutationen interferieren nicht mit der neuronalen Morphologie

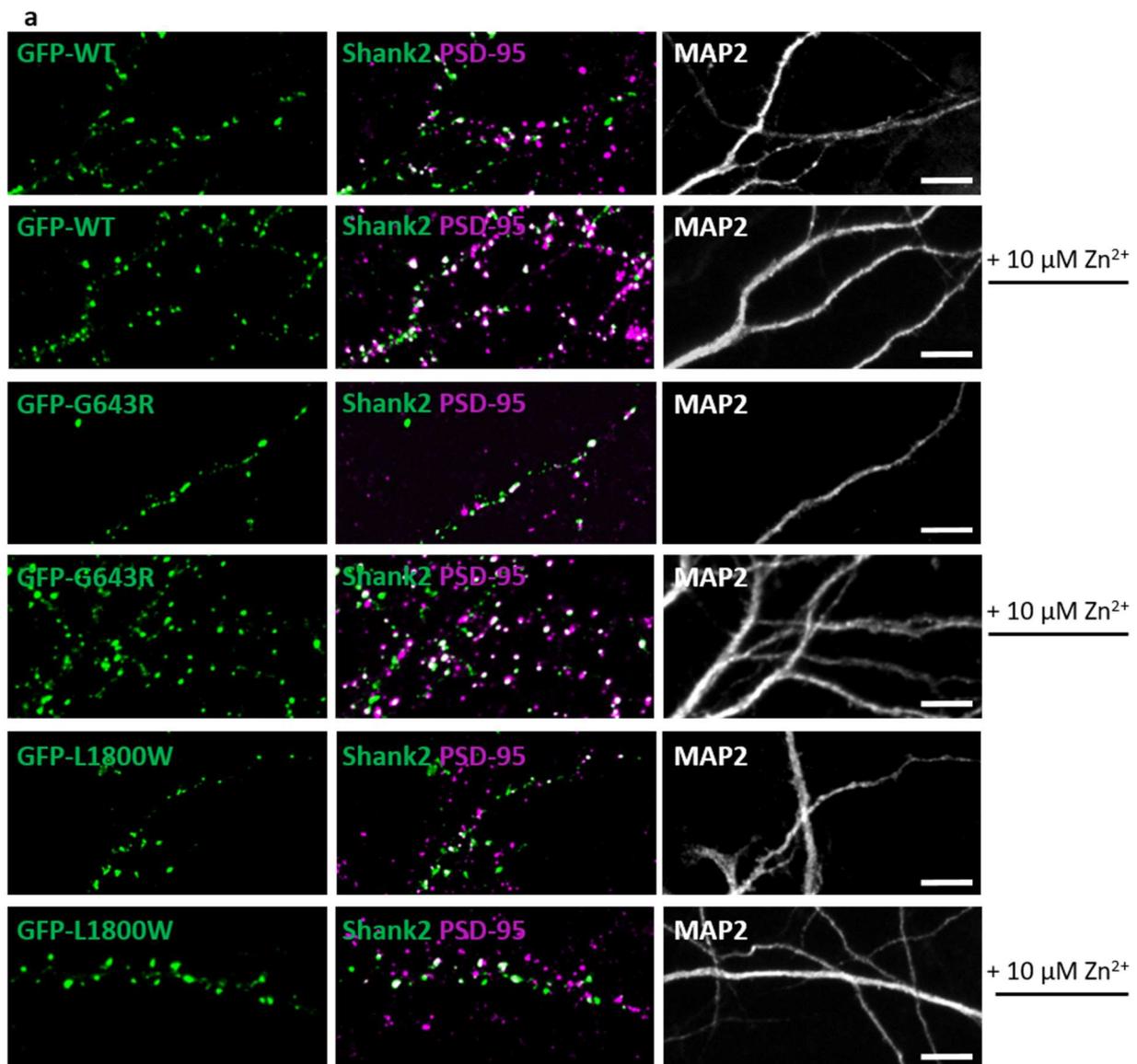
Um den Einfluss der Mutationen G643R und L1800W auf die neuronale Morphologie zu untersuchen, wurden hippocampale Neuronen mit den GFP-markierten *SHANK2*-Varianten und der *Shank2*-shRNA kotransfiziert und mikroskopisch analysiert. Sowohl der WT als auch die beiden Mutanten bildeten GFP-markierte Proteincluster in mehrheitlich kurzer Distanz zu den Dendriten, sodass auf eine jeweils synaptische Lokalisation der Fusionsproteine geschlossen werden konnte (Abbildung 27a). Im Vergleich zu überexprimiertem GFP-Shank3 bildete *Shank2* weniger, dafür ungleichförmigere Cluster. Weder im Hinblick auf die dendritische Komplexität (Anzahl der Primärdendriten pro Neuron; Abbildung 27b) noch bezüglich der Morphologie der dendritischen Dornen (Analyse der Distanz zwischen dendritischem Dorn und dendritischem Schaft als Maßstab für die Länge der *spines*; Abbildung 27c) konnte ein signifikanter Unterschied für eine der Mutanten im Vergleich zum WT ermittelt werden.

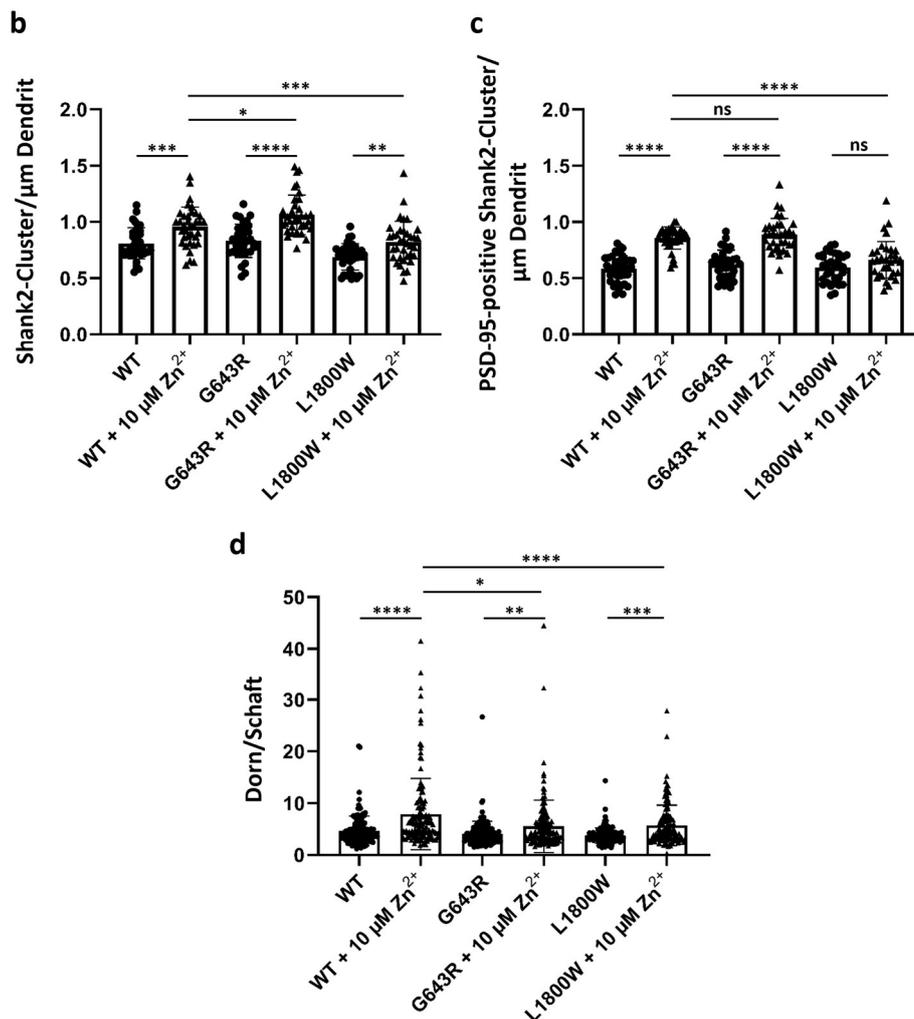


**Abbildung 27: Die missense-Mutationen G643R und L1800W beeinflussen weder die dendritische Komplexität noch die Morphologie der dendritischen Dornen.** (a) Primäre hippocampale Neuronen wurden mit GFP-SHANK2-Varianten sowie einem *Shank2*-shRNA-Vektor kotransfiziert und mit einem Antikörper gegen MAP2 gefärbt. Die Neuronen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Skalierungsbalken 20 µm). (b) Quantitative Analyse der Anzahl der Primärdendriten pro Neuron. ns: nicht signifikant abweichend vom WT; Analyse von 15 Neuronen aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test. (c) Die Distanz zwischen dem Kopf der dendritischen Dornen und dem dendritischen Schaft wurde gemessen. ns: nicht signifikant abweichend vom WT; Analyse von 50 dendritischen Dornen von 10 Neuronen aus drei unabhängigen Experimenten; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

### 3.4.4 Eine Zn<sup>2+</sup>-Langzeitbehandlung fördert das postsynaptische *targeting* von Shank2

Um zu untersuchen, ob eine höhere Zn<sup>2+</sup>-Konzentration die Defizite der Mutanten im Hinblick auf das postsynaptische *targeting* ausgleichen könnte, wurden mit GFP-*SHANK2*-Varianten sowie *Shank2*-shRNA kotransfizierte Neuronen für 3,5 Tage mit 10 μM zusätzlichem Zn<sup>2+</sup> inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 28a). Die Erhöhung der Zn<sup>2+</sup>-Konzentration führte für den WT zu einem Anstieg in der Anzahl der Shank2-Cluster (Abbildung 28b) sowie der PSD-95-positiven Shank2-Cluster (postsynaptische Cluster; Abbildung 28c). Außerdem konnte das GFP-Shank2-Signal nach der Zn<sup>2+</sup>-Behandlung signifikant verstärkt in den dendritischen Dornen im Vergleich zum dendritischen Schaft detektiert werden (Dorn/Schaft-Ratio; Abbildung 28d). Die G643R-Mutante zeigte im Hinblick auf die Anzahl der Shank2-Cluster die gleiche Tendenz wie der WT. Auch für die G643R-Variante kam es im Zuge der Zn<sup>2+</sup>-Behandlung zu einem Anstieg des Dorn/Schaft-Ratios, allerdings fiel diese Erhöhung weniger stark aus als für das WT-Protein. Für die L1800W-Mutante konnten nur abgeschwächte Auswirkungen der Zn<sup>2+</sup>-Behandlung festgestellt werden. Zwar konnte ein Anstieg der Shank2-Clusterdichte sowie eine Erhöhung des Dorn/Schaft-Ratios beobachtet werden, allerdings waren diese Effekte weniger drastisch im Vergleich zum WT. Interessanterweise konnte kein Anstieg der postsynaptischen Shank2-Cluster verzeichnet werden.



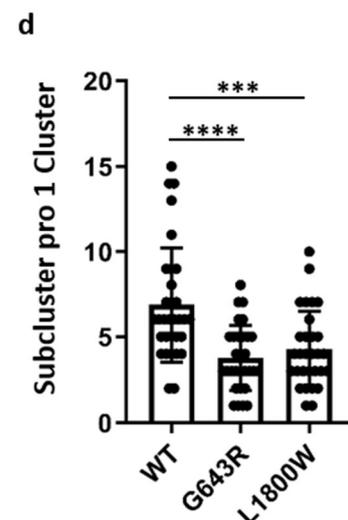
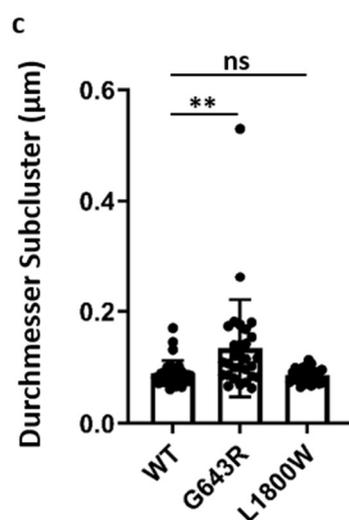
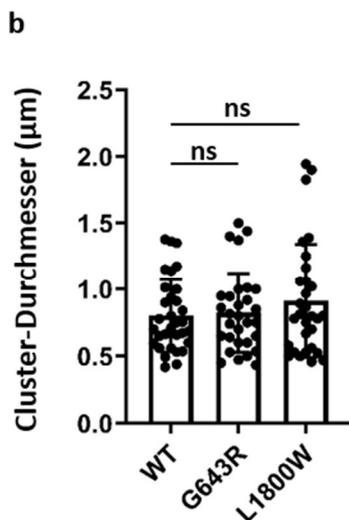
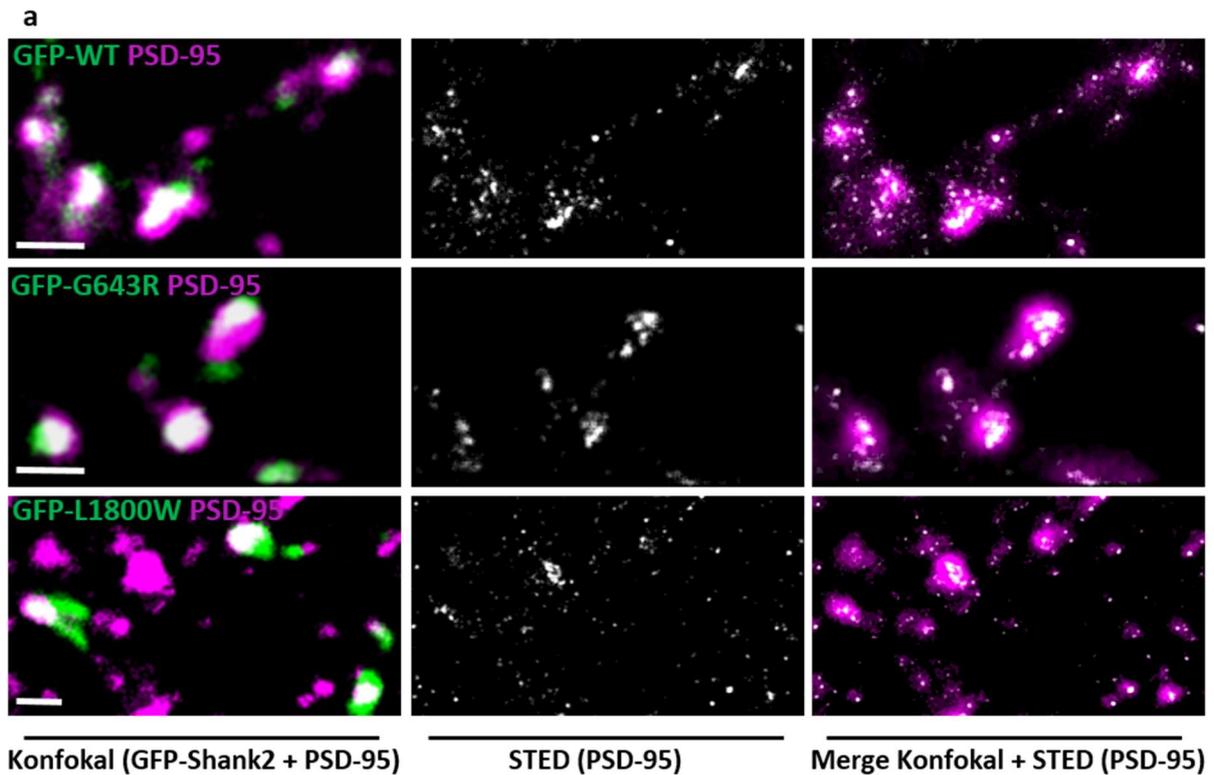


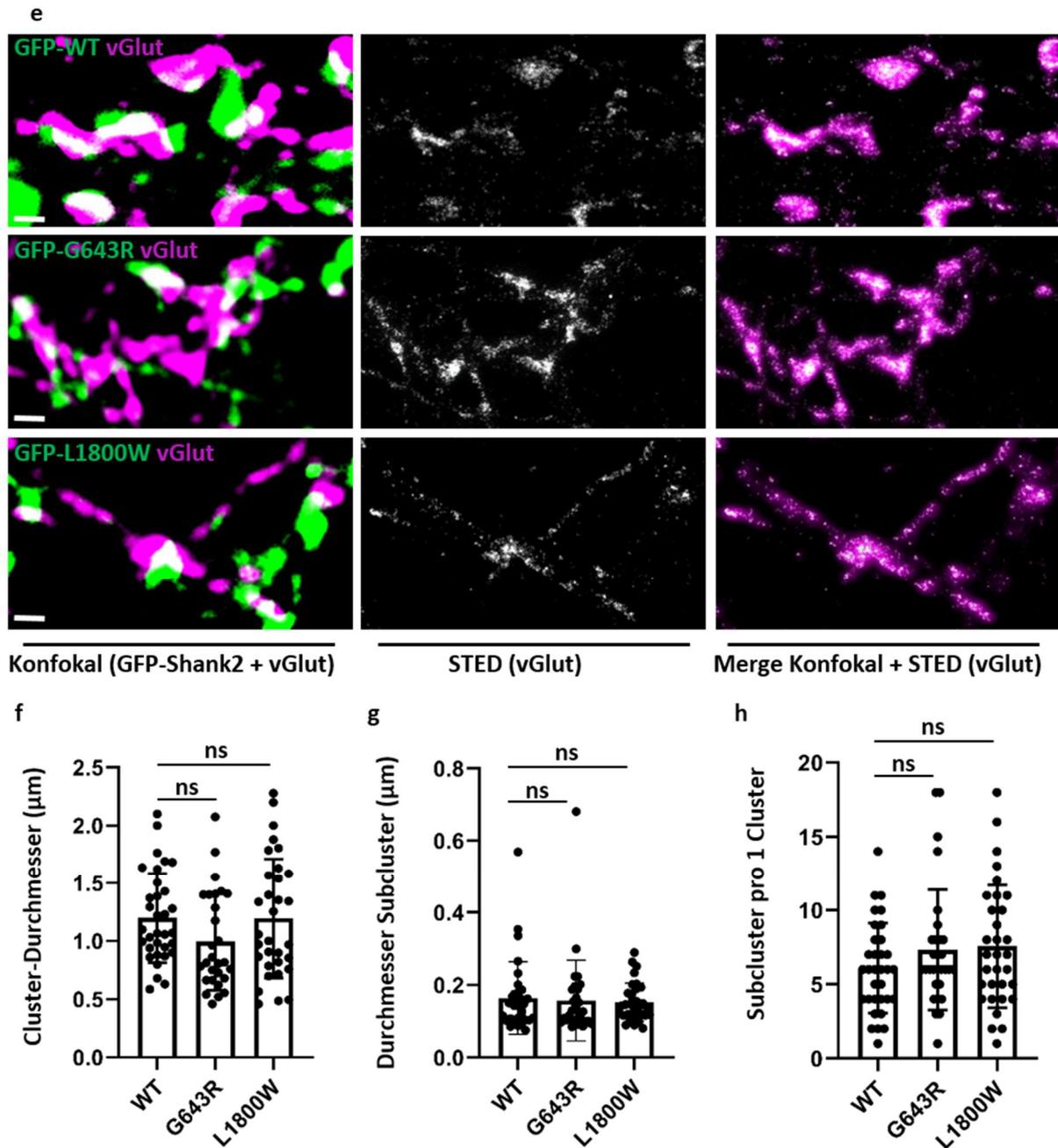
**Abbildung 28: Sowohl die G643R- als auch die L1800W-Mutation interferieren mit dem postsynaptischen targeting von Shank2.** (a) Primäre hippocampale Neuronen wurden mit Expressionsvektoren für GFP-*SHANK2*-Varianten sowie mit einem *Shank2*-shRNA-Vektor kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Neuronen für 3,5 Tage mit 10 μM ZnCl<sub>2</sub> behandelt. Die Neuronen wurden mit Antikörpern gegen MAP2 (dendritischer Marker; grau) und PSD-95 (postsynaptischer Marker; magenta) angefärbt. Die Zellen wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Darstellung dendritischer Abschnitte; Skalierungsbalken: 5 μm). (b+c) Analyse von mindestens 36 dendritischen Abschnitten von 12-15 Neuronen aus drei unabhängigen Experimenten. (b) Quantitative Analyse der Anzahl der GFP-Shank2-Cluster pro μm Dendrit. (c) Quantitative Analyse der PSD-95-positiven Shank2-Cluster pro μm Dendrit. (d) Quantitative Analyse von 140 dendritischen Clustern von 14 Neuronen aus drei unabhängigen Experimenten. Das Ratio der Intensität eines GFP-positiven dendritischen Clusters wurde in Relation zu der GFP-Intensität im anliegenden dendritischen Schaft bestimmt. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*: Signifikant abweichend vom WT, p<0,05, p<0,01, p<0,001, p<0,0001; Two-way ANOVA mit anschließendem Sidac bzw. Dunnett-Test.

### 3.4.5 *SHANK2*-missense-Mutationen verändern die nanoscale-Organisation von PSD-95

Gerüstproteine der postsynaptische Dichte akkumulieren innerhalb der Synapsen in Domänenstrukturen, die eine Größe von ca. 80 nm aufweisen. Wie das targeting von postsynaptischen Proteinen wie z.B. Shank zu diesen Nanodomänen/Nanoclustern reguliert wird, ist bisher gänzlich unbekannt. Mithilfe einer Kombination aus konfokaler und 2D-STED-Mikroskopie konnte in der AG Kreienkamp bereits gezeigt werden, dass die *SHANK2*-missense-Mutationen G643R und L1800W mit der Organisation der Shank2-Nanocluster in Synapsen interferieren.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend untersuchte ich, ob und inwiefern die *nanoscale*-Organisation weiterer endogener post- bzw. präsynaptischer Proteine (PSD-95 bzw. vGlut) durch die Expression der Shank2-Mutanten beeinflusst wird. Dafür wurden hippocampale Neuronen mit den GFP-*SHANK2*-Varianten zusammen mit dem *Shank2*-shRNA-Vektor kotransfiziert und mithilfe von konfokaler sowie 2D-STED-Mikroskopie analysiert (Abbildung 29). Es wurden im konfokalen Modus Cluster entlang dendritischer Abschnitte identifiziert, die positiv für sowohl Shank2 als auch für PSD-95 (Abbildung 29a) bzw. vGlut (Abbildung 29e) waren. Die selektierten PSD-95/vGlut-Cluster wurden anschließend mittels STED-Mikroskopie auf *nanoscale*-Ebene in meist mehrere Subclusterstrukturen aufgelöst.





**Abbildung 29: Shank2-missense-Mutationen verändern die Nanocluster-Organisation in der postsynaptischen Dichte.** (a+e) Hippocampale Rattenneuronen wurden mit GFP-SHANK2-Varianten und einem *Shank2*-shRNA-Vektor kotransfiziert und mit Antikörpern gegen PSD-95 bzw. vGlut angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. PSD-95 bzw. vGlut-Cluster, für die im konfokalen Modus eine Kolokalisierung mit GFP-Shank2 beobachtet werden konnte, wurden mittels 2D-STED-Mikroskopie in Subclusterstrukturen aufgelöst (die kolokalisierenden Bereiche sind im linken Panel jeweils in weiß dargestellt; Skalierungsbalken 1 µm). (b+f) Quantitative Analyse der PSD-95- bzw. vGlut-Cluster-Größe im konfokalen Modus. (c+g) Quantitative Analyse der Größe der PSD-95- bzw. vGlut-Subcluster. (d+h) Quantitative Analyse der Anzahl der PSD-95- bzw. vGlut-Subcluster pro Cluster. \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*: signifikant abweichend vom WT,  $p < 0,01$ ,  $0,001$ ,  $0,0001$ ; ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test.

Die Analyse der Shank2-assoziierten PSD-95-Nanocluster erschien dabei besonders interessant, da PSD-95 über das Gerüstprotein GKAP indirekt mit Shank2 interagiert. Während die *missense*-Mutationen keine Auswirkungen auf die Größe der im konfokalen Modus selektierten PSD-95-Cluster zeigten (Abbildung 29b), konnte für beide Mutationen eine signifikante Veränderung der Organisation

der Nanocluster beobachtet werden. Die G643R-Mutation führte hierbei zur Ausbildung größerer PSD-95-Subcluster (Abbildung 29c). Darüber hinaus wurden für beide Mutanten in den selektierten PSD-95-Clustern durchschnittlich weniger Subcluster gezählt (Abbildung 29d), sodass angenommen werden konnte, dass beide Mutationen mit der Verdichtung des Shank2-Proteins in Nanoclusterstrukturen interferieren. Die partielle Kolo-kalisierung der Shank2-Cluster mit dem präsynaptischen Marker vGlut bestätigte die Annahme, dass die Shank2-*punctae* in unmittelbarer Nähe zu präsynaptischen Nervenenden lokalisiert sind (Abbildung 29e). Dagegen ergab die STED-Analyse von Shank2-positiven vGlut-Clustern keine durch die *missense*-Varianten bedingten Unterschiede im Hinblick auf die Größe oder Anzahl der vGlut-(Sub)cluster (Abbildung 29f-h).

## 4 Diskussion

### 4.1 *Missense*-Mutationen im *SHANK3*-Gen führen über verschiedene Pathomechanismen zu neurologischen Entwicklungsstörungen

#### 4.1.1 Die ADHS-assoziierte L270M-Mutation beeinträchtigt die Shank3- $\delta$ -Catenin-Interaktion

Mutationen im *SHANK3*-Gen konnten bisher hauptsächlich mit Autismus-Spektrum-Störungen, Schizophrenie und/oder geistiger Behinderung in Verbindung gebracht werden (Durand *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2010; Leblond *et al.*, 2014). Die neu identifizierte *missense*-Mutation L270M erweitert das phänotypische Spektrum um ADHS und oppositionelle Verhaltensstörungen (ODD). Zwar konnte ADHS zuvor bereits mit dem *SHANK2*-Gen (Ma *et al.*, 2021), mit einer *SHANK3*-Duplikation (Han *et al.*, 2013) sowie mit einer *frameshift*-Mutation (Kanani *et al.*, 2018) in *SHANK3* assoziiert werden, allerdings verknüpft die L270M-Variante erstmalig ADHS mit einer *SHANK3*-*missense*-Mutation. Da diese Variante mit dem vergleichsweise milderen neuropsychiatrischen Krankheitsbild in der Patientenfamilie segregiert (Abbildung 6), kann bereits ausgehend von dem Familienstammbaum auf die Pathogenität von L270M geschlossen werden.

Um die Pathogenität der L270M-Mutation sowie von acht weiteren bis dato unerforschten *missense*-Mutationen des Shank3-N-Terminus zu bestätigen, wurden diese Varianten im Hinblick auf mögliche Beeinträchtigungen der Shank3-Funktion analysiert. Dafür wurden unter anderem verschiedene Interaktionsstudien mit bekannten Bindungspartnern des Shank3-N-Terminus durchgeführt, bei denen HEK293T-Zellen mit *SHANK3*-Konstrukten transfiziert wurden, die für mRFP, die SPN-Domäne und die Ankyrin-Wiederholungen codierten. Das HEK293T-Zellsystem ermöglicht im Gegensatz zu primärkultivierten Neuronen die simple Durchführung von Ko-IP-Experimenten. Darüber hinaus werden in HEK293T-Zellen eine Reihe neuronenspezifischer Gene exprimiert, da die HEK-Zelllinie aus unreifen neuronalen Zellen der embryonalen Niere hervorgegangen ist (Shaw *et al.*, 2002). Eine Limitierung der Ergebnisse dieser Interaktionsstudien besteht allerdings darin, dass in Ko-IP-Experimenten auch indirekte Proteininteraktionen detektiert werden. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass beobachtete Interaktionen über ein unbekanntes zelluläres Protein vermittelt werden. Eine weitere mögliche Limitierung setzt bei der Größe des verwendeten Shank3-Proteins an. In den Interaktionsstudien wurde nicht mit der längsten Shank3-Isoform gearbeitet, sondern mit einem verkürzten Protein. Zwar gibt es eine Shank3-Isoform, die nur aus dem N-terminalen Bereich von Shank3 besteht (Shank3a/b) (Wang *et al.*, 2014), allerdings wird diese Transkriptvariante vermutlich nicht erfolgreich zu den Synapsen transportiert. Die Verwendung des verkürzten Proteins bringt jedoch auch Vorteile mit sich. Es sollte berücksichtigt werden, dass Interaktionspartner an mehreren Stellen innerhalb des Shank3-Proteins binden können. So interagiert die CaMKII $\alpha$  nicht nur mit dem Shank3-N-Terminus, sondern bindet auch an ein kurzes Segment C-terminal der PDZ-Domäne von Shank3 (Perfitt *et al.*, 2020b). Somit hätte die Möglichkeit bestanden,

dass isolierte Effekte wie z.B. für Q106P im Kontext des Shank3-Proteins der vollen Länge überdeckt worden wären. Des Weiteren befindet sich in der Sequenz von Shank3 C-terminal der Ank-Wiederholungen zwischen den Aminosäuren 339 – 376 eine Kernlokalisationssequenz (Hassani Nia *et al.*, 2020a). Da im Zuge der funktionellen Charakterisierung der *missense*-Varianten die Bindung an zytosolische Interaktionspartner analysiert werden sollte, hätte eine Lokalisierung des Shank3-Fragmentes im Zellkern voraussichtlich mit den Experimenten interferiert.

Die einzige funktionelle Veränderung, die für L270M festgestellt werden konnte, betraf die Interaktion mit  $\delta$ -Catenin (Tabelle 19). Das postsynaptische  $\delta$ -Catenin wird neuronenspezifisch gebildet und kann zur p120ctn-Unterfamilie der Cateninproteine gezählt werden (Ho *et al.*, 2000).  $\delta$ -Catenin nimmt dabei eine wesentliche Rolle bei Zelladhäsionsprozessen und der dendritischen Morphogenese ein (H. Kim *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 1999). Der heterozygote Verlust von  $\delta$ -Catenin führt zu einer schwerwiegenden Kombination geistiger und physischer Behinderungen (Katzenschrei-Syndrom; Medina *et al.*, 2000)). Weitere *loss-of-function*-Mutationen (Deletionen und unbalancierte Translokationen) in diesem Gen resultieren hingegen in einem schwer autistischen Phänotyp (Turner *et al.*, 2015). Unsere bereits publizierten Daten deuten darauf hin, dass die Interaktion des Shank3-N-Terminus mit  $\delta$ -Catenin für das postsynaptische *targeting* von  $\delta$ -Catenin benötigt wird (Hassani Nia *et al.*, 2020b).

**Tabelle 19: Zusammenfassung der funktionellen Charakterisierung der untersuchten SHANK3-Mutationen.**

Funktion	D69G	Q106P	P141A	G250C	Q256H	L270M	Y272C	Q317R	T337S
HRas-/Rap1a-Interaktion (vermittelt durch SPN)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\delta$ -catenin-Interaktion (vermittelt durch Ank)	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓	—	—
$\alpha$ -Fodrin Interaktion (vermittelt durch Ank)	—	—	↑	—	—	—	—	—	—
Intramolekulare SPN-Ank-Interaktion	—	—	↓	—	—	—	—	—	—
CaMKII $\alpha$ -Interaktion (vermittelt durch SPN Linker)	—	↓	↓	—	—	—	—	—	—
Shank3-Cluster-Bildung in Neuronen	✘	—	—	✘	✘	—	✘	✘	✘
Postsynaptische Shank3-Cluster-Bildung in Neuronen	✘	—	↓	✘	✘	—	✘	✘	✘
Verzweigung der Neuronen	✘	—	—	✘	✘	—	✘	✘	✘

 erhöht
  verringert
  unverändert
  nicht getestet

Genau wie fünf weitere untersuchte Mutationen in den Ankyrin-Wiederholungen führte L270M zu einer signifikant reduzierten Bindung an den postsynaptischen Interaktionspartner  $\delta$ -Catenin. In der AG Kreienkamp konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass die Ank-Wiederholungen die Shank3-

Bindung an  $\delta$ -Catenin vermitteln (Hassani Nia *et al.*, 2020b), sodass vermutet werden kann, dass diese Mutationen die Bindungsschnittstelle zwischen Ank und  $\delta$ -Catenin beeinträchtigen. Die Mutationen Q317R und T337S sind zwar im siebten *ankyrin repeat* lokalisiert, zeigten jedoch keinen Effekt auf die  $\delta$ -Catenin-Interaktion, sodass geschlussfolgert werden kann, dass der C-terminale-Bereich der Ank-Wiederholungen nicht wesentlich an der Bindung beteiligt ist. Der Aminosäurerest Leucin270, der sich eher verdeckt im hydrophoben Kern der Ank-Domäne befindet (Abbildung 7), scheint jedoch wichtig für die  $\delta$ -Catenin-Interaktion zu sein. Unsere auf der 3D-Struktur des Shank3-N-Terminus basierende bioinformatische Analyse ergab eine nur sehr geringe lösungsmittelzugängliche Oberfläche für Leu270 (3%; Woike *et al.*, 2022). Zudem scheint die L270M-Mutation eine Verringerung der thermodynamischen Stabilität des Proteins zu verursachen ( $\Delta\Delta G = +1,11$  kcal/mol; berechnet mit dem Programm PoPMuSiC). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die L270M-Mutation zu einer globalen Entfaltung des Shank3-N-Terminus führt, da abgesehen von der  $\delta$ -Catenin-Bindung keine Interaktionen zu weiteren Bindungspartnern beeinflusst werden und auch kein Effekt im Hinblick auf den intramolekularen SPN-Ank-Kontakt festgestellt werden konnte. Vielmehr könnte angenommen werden, dass der Austausch des Leucin-Restes gegen ein Methionin die Oberfläche der Ankyrin-Wiederholungen lokal (geringfügig) modifiziert, sodass die  $\delta$ -Catenin-Bindung nicht mehr ausreichend stattfinden kann. In der Konsequenz könnte eine verringerte/fehlende Shank3-Catenin-Interaktion zu einer Beeinträchtigung des postsynaptischen *targetings* von  $\delta$ -Catenin führen. Es mag spekuliert werden, dass die verringerte Präsenz von  $\delta$ -Catenin an der Postsynapse einen synaptischen Signalweg so stört, dass es zur Ausbildung einer neurologischen Entwicklungsstörung (wie z.B. ADHS oder ASS) kommt.

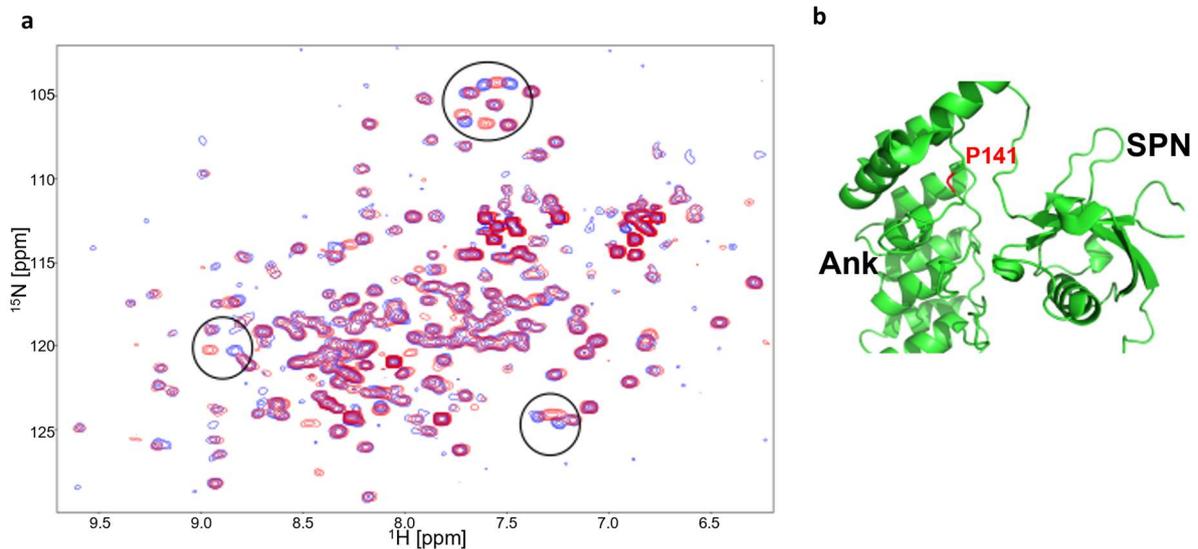
Auch die in den Ank-Wiederholungen lokalisierten *missense*-Mutationen G250C, Q256H und Y272C zeigten nur im Hinblick auf die  $\delta$ -Catenin-Interaktion einen funktionellen Effekt. Während die Y272C-Mutation mit einer geistigen Behinderung sowie Autismus assoziiert werden kann, liegen für G250C und Q256H leider keine adäquaten Beschreibungen des jeweiligen Phänotyps vor (Tabelle 18). Da die Y272C-Variante aus Zeitgründen nicht in hippocampalen Neuronen analysiert worden war, bleibt ungewiss, ob und inwieweit sich die Y272C-Mutation auf die neuronale Morphologie bzw. spezifisch auf die synaptische Lokalisation von Shank3 auswirkt und inwiefern die Analyse dieser Mutation auf neuronalem Level zum besseren Verständnis des schwerwiegenden Phänotyps des Patienten beitragen würde. Um herauszufinden, ob eine verringerte  $\delta$ -Catenin-Bindung des Shank3-Proteins zu einem milderen neuropsychiatrischen Phänotyp (wie für L270M beobachtet) führt, müssten in jeden Fall mehr Patienten/Varianten funktionell analysiert werden. Interessanterweise wurde allerdings kürzlich gezeigt, dass *loss-of-function*-Mutationen im Gen, welches für  $\delta$ -Catenin codiert (*CTNND2*), in mehreren Patienten mit einem ADHS-Phänotyp assoziiert sind (Adegbola *et al.*, 2020).

#### **4.1.2 Die ASS-assoziierte P141A-Mutation interferiert massiv mit der Funktion von Shank3**

Für die drei *missense*-Mutationen D69G (ASS-assoziiert), Q317R (leider keine Beschreibung des Phänotyps vorhanden) und T337S (assoziiert mit Autismus und geistiger Behinderung) konnten im Zuge dieser Arbeit keine Beeinträchtigungen der Shank3-Funktion festgestellt werden. Die Pathogenität dieser Varianten konnte somit im Rahmen der durchgeführten Interaktionsstudien nicht untermauert werden. Für eine weitreichendere Einschätzung der Pathogenität könnten die drei Mutationen zudem in Neuronen im Hinblick auf funktionelle Effekte analysiert werden.

Im Gegensatz zu D69G, Q317R und T337S wurden für die P141A-Mutation erhebliche Auswirkungen auf die Shank3-Funktion beobachtet. Unter anderem interferiert P141A mit den intramolekularen Interaktionen innerhalb des Shank3-N-Terminus, reduziert die Bindung an  $\delta$ -Catenin und die CaMKII $\alpha$  und führt zu einer deutlich verstärkten  $\alpha$ -Fodrin-Interaktion. Dabei erscheint die mutationsbedingte Öffnung der SPN-Ank-Tandemstruktur, die in dieser Arbeit mittels FRET-Lebendzellmessungen

demonstriert wurde, entscheidend für die Pathomechanismen dieser Variante zu sein. Experimente aus der AG unseres Kooperationspartners Igor Barsukov geben detailliert Aufschluss über die Auswirkungen der P141A-Mutation auf struktureller Ebene.  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren der Ank-Domäne unterschieden sich im Hinblick auf die chemischen Verschiebungen der aufgenommenen Signale nur in Nuancen zwischen dem WT und P141A, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die P141A-Mutation die Ank-Domäne nicht entfaltet, sondern in der unmittelbaren Nähe der Mutationsstelle lokale Veränderungen in der Proteinstruktur hervorruft (Abbildung 30a).

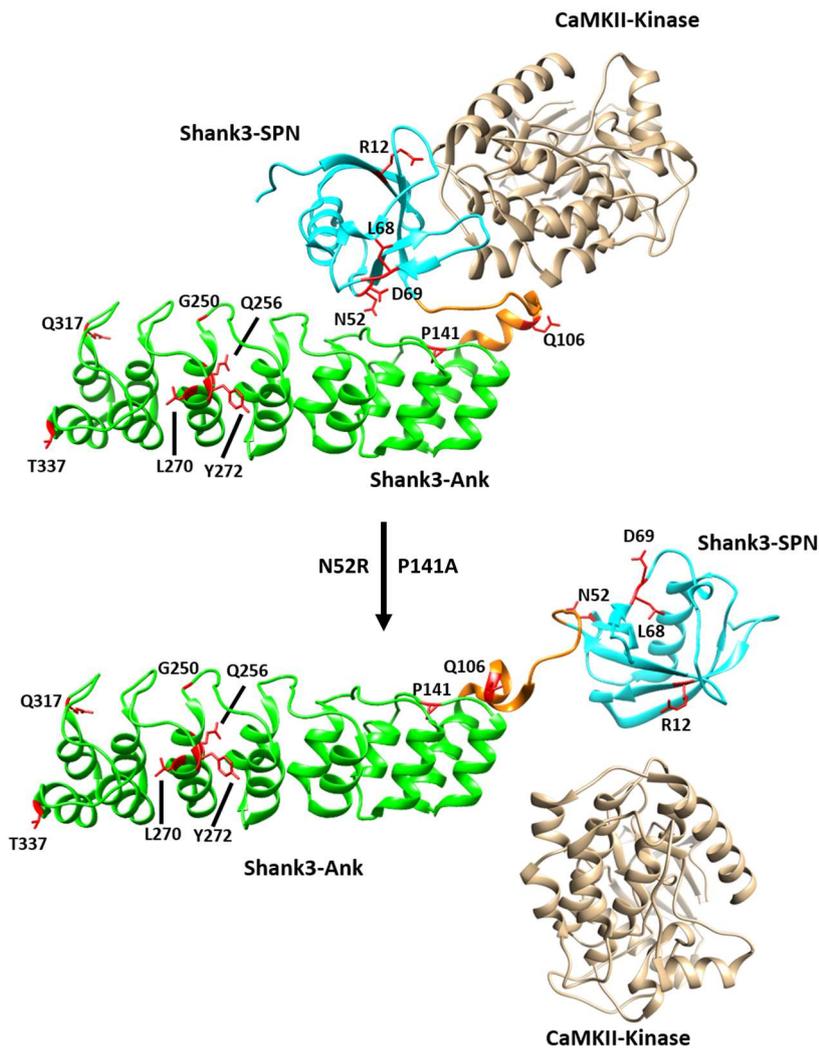


**Abbildung 30: Auswirkungen der P141A-Mutation auf die Shank3-Ank-Domäne.** (a) Superposition der chemischen Verschiebungen in den  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren der WT-Ank-Domäne (blau) sowie von P141A-Ank (rot). Die Kreise zeigen die wesentlichen Unterschiede zwischen den Spektren an. (b) Kristallstruktur des Shank3-N-Terminus (5G4X). Der Prolinrest 141 an der Schnittstelle den Ankyrin-Wiederholungen und der Linker-Region/SPN-Domäne ist in Rot hervorgehoben. Diese Abbildung wurde von Igor Barsukov erstellt und in Woike *et al.*, 2022 publiziert.

P141 ist in der Struktur des Shank3-N-Terminus in einem *loop* zwischen den Helices der ersten Ankyrin-Wiederholung lokalisiert, die sich in intensivem Kontakt mit der Linker-Region befindet (Abbildung 30b). Der Prolinrest erzeugt mit seiner starren Ringstruktur einen Knick im Proteinerückgrat, sodass der Linker und der erste *ankyrin repeat* eng aneinander liegen. Dieser enge Kontakt wird vermutlich durch den Einbau eines Alanins aufgehoben, sodass die intramolekularen SPN-Ank-Interaktionen entscheidend gestört werden.

Es ist im hohen Maße interessant, dass die räumliche Separation der SPN-Domäne von den Ankyrin-Wiederholungen durch Mutationen wie P141A oder N52R auch mit einem Verlust der Bindung an die CaMKII $\alpha$  einhergeht. Während in der geschlossenen Konformation die Bindungsstelle innerhalb des Shank3-N-Terminus, gebildet durch die SPN-Domäne sowie die Linker-Region, gut für die CaMKII $\alpha$  zugänglich ist, verändert sich die spezifische Geometrie dieser Bindungsstelle durch den Verlust des intramolekularen SPN-Ank-Kontaktes (Abbildung 31). Auch die Mutationen L68P und Q106P interferieren mit der CaMKII $\alpha$ -Bindung, wobei der Effekt der L68P-Variante auf die Entfaltung der SPN-Domäne zurückzuführen ist (Bucher *et al.*, 2021; Mameza *et al.*, 2013). Die Q106P-Mutation führt, analog zu der bereits zuvor charakterisierten R12C-Variante (Cai *et al.*, 2020b), aufgrund des direkten Kontaktes zu der CaMKII $\alpha$  zu einem Abbruch der Interaktion. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis hatten auch Cai *et al.* 2020 gezeigt, dass die Mutation von Aminosäureresten der Linker-Region (Ile102) die CaMKII $\alpha$ -Interaktion sehr stark reduzieren kann. Da neben R12C nun auch drei weitere ASS-assoziierte *missense*-Mutationen im Shank3-N-Terminus identifiziert wurden, welche die CaMKII $\alpha$ -

Bindung signifikant beeinträchtigen, stellt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser Interaktion. Dieser Aspekt wird im Detail im Abschnitt 4.2 diskutiert.



**Abbildung 31: Übergang von der geschlossenen zu der offenen Konformation des Shank3-N-Terminus im Modell.** In der geschlossenen Konformation bilden die SPN-Domäne und die Ankyrin-Wiederholungen, verbunden über eine Linker-Struktur, eine scharnierartige Tandemfaltung aus. Die autoinhibierte Form der CaMKII $\alpha$  bindet über Interaktionen mit der SPN-Domäne und der Linker-Region großflächig an die geschlossene Konformation. Die Aminosäurereste R12 und Q106 befinden sich dabei in direktem Kontakt zur CaMKII $\alpha$ . Der Verlust der intramolekularen SPN-Ank-Interaktionen (bspw. durch Mutationen wie N52R oder P141A) resultiert in einer veränderten Geometrie der CaMKII $\alpha$ -Bindungsstelle, sodass die Kinase nicht an die offene Konformation binden kann. Das Modell basiert auf der Kristallstruktur des Shank3-N-Terminus (5G4X; Lilja *et al.*, 2017) sowie auf dem Modell des Shank3-CaMKII $\alpha$ -Komplexes (Darstellung der Kinasedomäne der CaMKII $\alpha$ ; Cai *et al.*, 2020b).

Während Q106P und L270M vergleichsweise spezifisch mit der  $\delta$ -Catenin-Interaktion (Q106P, L270M) bzw. der CaMKII $\alpha$ -Bindung (Q106P) interferieren, ist P141A mit der Störung zahlreicher N-terminaler Interaktionen assoziiert. Im Gegensatz zu Q106P und L270M konnte für die P141A-Mutation zudem eine Beeinträchtigung der synaptischen Funktion festgestellt werden: P141A führt in hippocampalen Neuronen zu einer verringerten Dichte postsynaptischer Shank3-Cluster. Die P141-Variante reduziert somit die Kapazität von Shank3, in hippocampalen Neuronen funktionelle Synapsen auszubilden. Die Vermutung liegt nahe, dass dieses Ergebnis auf die P141A-bedingte Öffnung der SPN-Ank-Tandemstruktur zurückzuführen ist; ein Effekt, der unter den neu charakterisierten *missense*-Mutationen exklusiv für P141A gefunden wurde. Mittels differenzieller *scanning*-Fluorimetrie wurde

bereits beobachtet, dass die räumliche SPN-Ank-Trennung den Shank3-N-Terminus (thermisch) destabilisiert, da für P141A ein deutlich niedriger Schmelzpunkt (39,4 °C) als für den WT (45,5 °C) ermittelt wurde (Experimente unserer Kooperationspartner Emily Wang und Igor Barsukov, publiziert in (Woike *et al.*, 2022)). Darüber hinaus resultiert die P141A-bedingte Domänenseparation nicht nur in einer Beeinträchtigung der CaMKII $\alpha$ -Interaktion, sondern führt über die Freilegung der Ank-Domäne auch zu einer verstärkten  $\alpha$ -Fodrin-Bindung. Interessanterweise erhöht der Einbau eines Alanins anstelle eines Prolinrestes die Affinität von  $\alpha$ -Fodrin für die Ank-Wiederholungen noch zusätzlich. Ein molekularer Mechanismus, der ausgehend von der Shank3-Fodrin-Bindung die Ausbildung einer Autismus-Spektrum-Störung beschreibt, ist bisher nicht bekannt. Die Interaktion des Aktin-bindenden postsynaptischen Proteins  $\alpha$ -Fodrin mit Shank3 stellt vermutlich eine physische Verknüpfung zwischen den Glutamatrezeptoren und dem Zytoskelett her (Böckers *et al.*, 2001). Für die ASS-assoziierten *SHANK3-missense*-Mutationen R300C und Q321R (beide Mutationen betreffen die Ank *repeats*) wurde bereits publiziert, dass sich über einen Aktin-abhängigen Mechanismus die Morphologie und die Dichte der dendritischen Dornen verändern (Durand *et al.*, 2012). Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die verstärkte  $\alpha$ -Fodrin-Bindung der P141A-Variante somit zu einer Fehlregulation des Aktin-Zytoskeletts der dendritischen Dornen führt, sodass folglich die Dichte Shank3-positiver postsynaptischer Cluster (gleichzusetzen mit dendritischen Dornen) herabgesetzt wird. Übereinstimmend mit dieser Theorie konnte bereits in einer Doktorarbeit in der AG Kreienkamp gezeigt werden (Hassani Nia, 2019), dass die ASS-assoziierte *missense*-Mutation L68P, die analog zu P141A zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Lokalisation von Shank3 in dendritischen Dornen führt (Bucher *et al.*, 2021), zu einer signifikant verstärkten  $\alpha$ -Fodrin-Bindung beiträgt (siehe auch Mameza *et al.*, 2013). Ergänzend zu der funktionellen Charakterisierung könnte eine elektrophysiologische Analyse zusätzliche Einblicke in den Pathomechanismus der P141A-Variante ermöglichen. Es wäre höchst interessant, über die Messung von mEPSCs in hippocampalen Neuronen herauszufinden, welche physiologischen Konsequenzen die Öffnung der SPN-Ank-Tandemfaltung durch die P141A-Mutation nach sich zieht.

Zusammengenommen lässt die funktionelle Charakterisierung der *missense*-Mutationen vermuten, dass sich die Varianten P141A und L270M an unterschiedlichen Enden der Mutationslandschaft des Shank3-N-Terminus befinden. Bei P141A handelt es sich um eine *de novo* Mutation, die mit zahlreichen Effekten auf die Shank3-Funktion assoziiert werden kann und die zu einer vergleichsweise schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörung inklusive Autismus und geistiger Beeinträchtigungen führt (Boccuti *et al.*, 2012). Die vererbte L270M-Mutation betrifft hingegen nur eine der in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen und ruft einen eher milden neuropsychiatrischen Phänotyp, gekennzeichnet durch ADHS und Lernbeeinträchtigungen, hervor.

## 4.2 Shank3 reguliert die Aktivierung der CaMKII $\alpha$ in der postsynaptischen Dichte

Die Aktivierung der Calciumkanäle der neuronalen Plasmamembran stimuliert zahlreiche intrazelluläre Signalwege. Der durch synaptische NMDA-Rezeptoren vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom induziert über die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Bindung die Autophosphorylierung des aus 12-Untereinheiten bestehenden Holoenzym CaMKII (Hell, 2014; Lisman *et al.*, 2012). Im Vorderhirn der Ratte bestehen diese Holoenzyme überwiegend aus CaMKII $\alpha$ -Homomeren sowie aus CaMKII $\alpha$ -CaMKII $\beta$ -Heteromeren (Brocke *et al.*, 1999). In der PSD bindet die CaMKII an andere postsynaptische Proteine und führt zur Phosphorylierung zahlreicher *downstream*-Effektoren (Miller and Kennedy, 1986). Unter anderem phosphoryliert die CaMKII die GluR1-Untereinheit des AMPA1-Rezeptors und erhöht so dessen Ionendurchlässigkeit (Derkach *et al.*, 1999). Noch entscheidender für die Langzeitpotenzierung (LTP) erscheint dabei die Phosphorylierung extrasynaptischer AMPA-Rezeptoren durch die CaMKII. Dabei ermöglicht die Phosphorylierung des mit AMPA-Rezeptoren assoziierten Proteins Stargazin die Bindung der Rezeptoren an PSD-95, wodurch die AMPA-Rezeptoren in der Synapse verankert werden

(Tomita *et al.*, 2005). Die Aktivierung der CaMKII ist somit erforderlich für die LTP-Induktion und gilt als Schlüssel für die synaptische Plastizität – die zelluläre Basis für Lernprozesse und Gedächtnisbildung (Lisman *et al.*, 2012). Neuere Studien zeigen außerdem, dass die CaMKII die Aminosäurereste Ser685 sowie Ser782 von Shank3 phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Ser685 verstärkt dabei die Bindung von Shank3 an Abi1 (Perfitt *et al.*, 2020a), während die Ser782-Phosphorylierung zu einer synaptischen Anreicherung von Shank3 beiträgt (Jeong *et al.*, 2021). Neben der Phosphorylierung unterschiedlichster Zielproteine interagiert die CaMKII mit mehreren synaptischen Proteinen. So ermöglicht die Bindung an die GluN2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors das *targeting* der CaMKII zu dendritischen Dornen, welches essentiell für die normale synaptische Plastizität ist (Bayer *et al.*, 2006, 2001; Strack and Colbran, 1998). Die Arbeitsgruppe von Roger Colbran konnte zudem Shank3 als Interaktionspartner für die aktivierte CaMKII $\alpha$ -Isoform etablieren (Perfitt *et al.*, 2020b). Die phosphorylierte Form der CaMKII $\alpha$  bindet dabei an eine Sequenz C-terminal der PDZ-Domäne von Shank3. Diese Shank3-CaMKII $\alpha$ -Interaktion führt im Zuge der von neuronalen L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen vermittelten Signaltransduktion zu einer erhöhten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB in neuronalen Nuclei. Die phospho-CREB-abhängige Genexpression nimmt dabei eine entscheidende Rolle für die synaptische Plastizität sowie die Gehirnentwicklung ein (Alberini, 2009; Kida and Serita, 2014). Erst kürzlich wurde zudem auch der Shank-N-Terminus als Interaktionspartner der inaktiven, nicht-phosphorylierten Form der CaMKII $\alpha$  identifiziert (Cai *et al.*, 2020b). Die ASS-assoziierten *missense*-Mutationen R12C, L68P, Q106P und P141A führen alle zu einer Beeinträchtigung dieser Shank3-NT-CaMKII $\alpha$ -Interaktion. Dabei ist die physiologische Relevanz der Bindung des Shank3-N-Terminus an die inaktive Form der CaMKII $\alpha$  vollkommen unklar. Meine *in vivo* Daten aus *Shank3 $\alpha\beta$* -defizienten Mäusen zeigten in der postsynaptischen Dichte, isoliert aus Hippocampus und Cortex, jeweils eine signifikant erhöhte Phosphorylierung (und damit Aktivierung) der CaMKII $\alpha$ . Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Shank3 über den N-Terminus als negativer Regulator für die CaMKII $\alpha$ -vermittelte Signaltransduktion fungiert. Insofern liegt die Vermutung nahe, dass *Shank3-missense*-Varianten, die nicht oder nur sehr reduziert an die CaMKII $\alpha$  binden, ebenso in Synapsen von Hippocampus und Cortex aufgrund des Wegfalls der inhibierenden Wirkung des Shank3-N-Terminus zu einer verstärkten basalen CaMKII $\alpha$ -Aktivität führen.

Für die Einordnung der Bedeutung der Shank3-NT-CaMKII $\alpha$ -Interaktion sollte auch die Rolle des kleinen G-Proteins Ras diskutiert werden. Die intrazellulär-verankerte GTPase Ras weist drei Isoformen auf (HRas, KRas und NRas), die ubiquitär in Säugetieren gebildet werden und an zahlreichen Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Han *et al.*, 2017; Hancock, 2003). Interessanterweise ist die neuronale Ras-Signaltransduktion in autistischen Patienten häufig beeinträchtigt (Ash *et al.*, 2021; Faridar *et al.*, 2014; Garg *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2013). Der am besten charakterisierte Ras-Signalweg – der Ras-MAP-Kinase-Weg – führt von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie dem *epidermal-growth-factor*-Rezeptor (EGF-Rezeptor) über die GTP-Beladung von Ras zu der Aktivierung zytosolischer und nukleärer Effektoren und beeinflusst in Neuronen unter anderem das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Nervenzellen in mannigfaltiger Weise (Zhong, 2016). In Synapsen ist Ras dabei wesentlich in die Regulation der Synapsenbildung und der synaptischen Plastizität involviert (Stornetta and Zhu, 2011; Yang *et al.*, 2013). Dabei besteht über das *synaptic Ras GTPase-activating protein 1* (SynGAP1) eine Verknüpfung zwischen der neuronalen Ras-Signalgebung und der CaMKII. So phosphoryliert die aktivierte CaMKII das in exzitatorischen Synapsen hoch angereicherte Protein SynGAP1, welches die GTPase-Aktivität von Ras stimuliert (Araki *et al.*, 2015). Nach der Phosphorylierung verlässt SynGAP1 allerdings die Synapse, sodass GTP-Ras nicht mehr zu GDP-Ras hydrolysiert wird und aktives Ras in der Postsynapse akkumuliert (Chen *et al.*, 1998). Die durch die CaMKII vermittelte Aktivierung der Ras-Signalwege führt in den frühen Phasen der Langzeitpotenzierung über Exozytoseprozesse zum Einbau von AMPA-Rezeptoren in die synaptische Plasmamembran (Lisman *et al.*, 2012; Patterson *et al.*, 2010). Die Ras-Aktivierung resultiert dabei über

den MEK-Erk- sowie den PI3K-PKB-Signalweg in der Phosphorylierung der langen zytoplasmatischen Enden der AMPA-Rezeptoren und stimuliert so die Beförderung dieser Rezeptoren in die Synapsen (Qin *et al.*, 2005; Stornetta and Zhu, 2011).

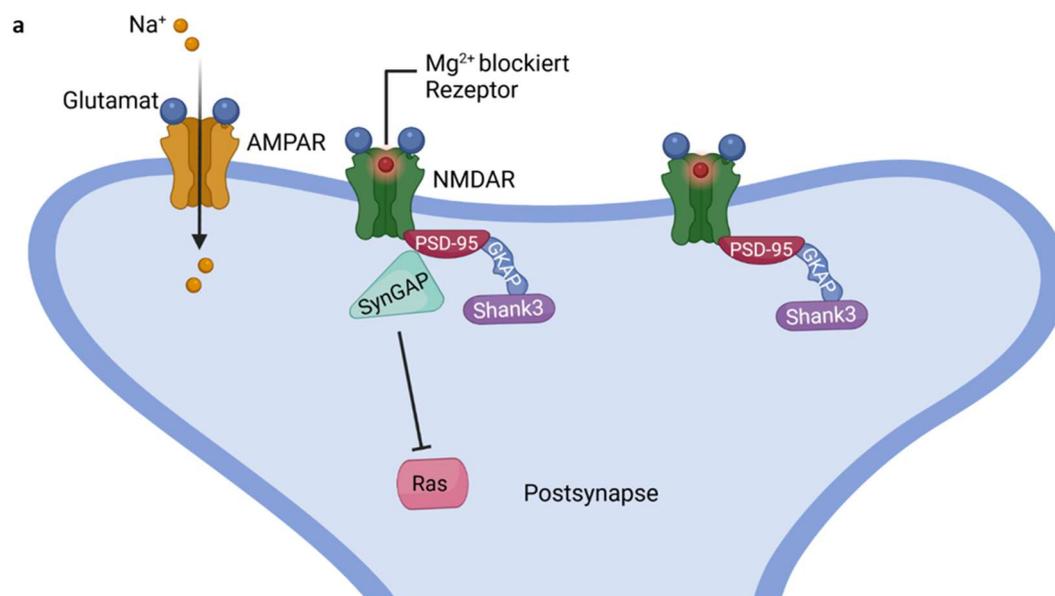
Genau wie die CaMKII $\alpha$  binden auch die kleinen G-Proteine Ras und Rap1 (eine GTPase aus der Ras-Familie) an die SPN-Domäne von Shank3 (Lilja *et al.*, 2017). Die hohe Affinität dieser Bindung (für Rap1 im nanomolaren Bereich) weist dabei auf die biologische Bedeutung dieser Interaktion hin. Interessanterweise scheinen sich die Bindungsstellen für Ras/Rap1 bzw. die CaMKII $\alpha$  innerhalb der SPN-Domäne zumindest partiell zu überschneiden (Cai *et al.*, 2020a, 2020b). Die 3D-Strukturen der jeweiligen Bindungspaare weisen dabei auf die Relevanz des in der SPN-Domäne lokalisierten Aminosäurerestes R12 hin, der über elektrostatische Wechselwirkungen die jeweilige Bindung wesentlich stabilisiert. Übereinstimmend mit den strukturellen Daten führt die ASS-assoziierte Mutation R12C in beiden Fällen zu einer signifikant beeinträchtigten Interaktion (Cai *et al.*, 2020b; Lilja *et al.*, 2017). Meine Interaktionsstudien zeigten, dass mit L68P eine weitere ASS-assoziierte Mutation neben der G-Protein-Bindung auch die CaMKII $\alpha$ -Interaktion nahezu auslöscht. Die Vermutung, dass kleine G-Proteine wie Ras oder Rap1 mit der CaMKII $\alpha$  um die Bindung an die SPN-Domäne konkurrieren, wurde allerdings in einem Wettbewerbsexperiment in HEK293T-Zellen nicht bestätigt. Auch in Anwesenheit der überexprimierten G-Proteine konnte das CaMKII $\alpha$ -Fusionsprotein effektiv an den Shank3-N-Terminus binden. Allerdings lässt dieses Experiment die Frage offen, in welcher wechselseitigen Beziehung die CaMKII $\alpha$ , Ras und Shank3 an der Postsynapse stehen.

Bisher unveröffentlichte Daten aus der AG Kreienkamp zeigen, dass Shank3 mit überexprimiertem, konstitutiv aktivem HRas (G12V-Variante) kolokalisiert (Hassani Nia, 2019). Zusammen treten die beiden Proteine vermehrt membransassoziiert entlang des dendritischen Schafts auf; weniger Shank3 gelangt in die dendritischen Dornen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass aktives Ras über die Bindung an das Gerüstprotein Shank3 an der Umstrukturierung der postsynaptischen Dichte beteiligt ist. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Huda Zoghbi (Houston, USA) zeigen zudem, dass Erk, eine der MAP-Kinasen, die *downstream* in der Ras-Signalgebung aktiviert werden, Shank3 an drei Aminosäureresten der C-terminalen Prolin-reichen Region phosphoryliert und somit den Abbau von Shank3 durch das Ubiquitin/Proteasom-System fördert, was ebenso zur Umstrukturierung der PSD beiträgt (Wang *et al.*, 2020a). Im Zuge der Langzeitpotenzierung ist die CaMKII nicht nur über die Ras-Aktivierung an der Reorganisation der PSD beteiligt, sondern auch direkt über die Phosphorylierung des Gerüstproteins GKAP. Die Phosphorylierung von GKAP, das zusammen mit Shank3 und PSD-95 den *PSD core complex* bildet, führt zu dessen Degradierung. Die CaMKII kontrolliert so die Proteinkomposition der PSD im Falle einer synaptischen Übererregung (Shin *et al.*, 2012).

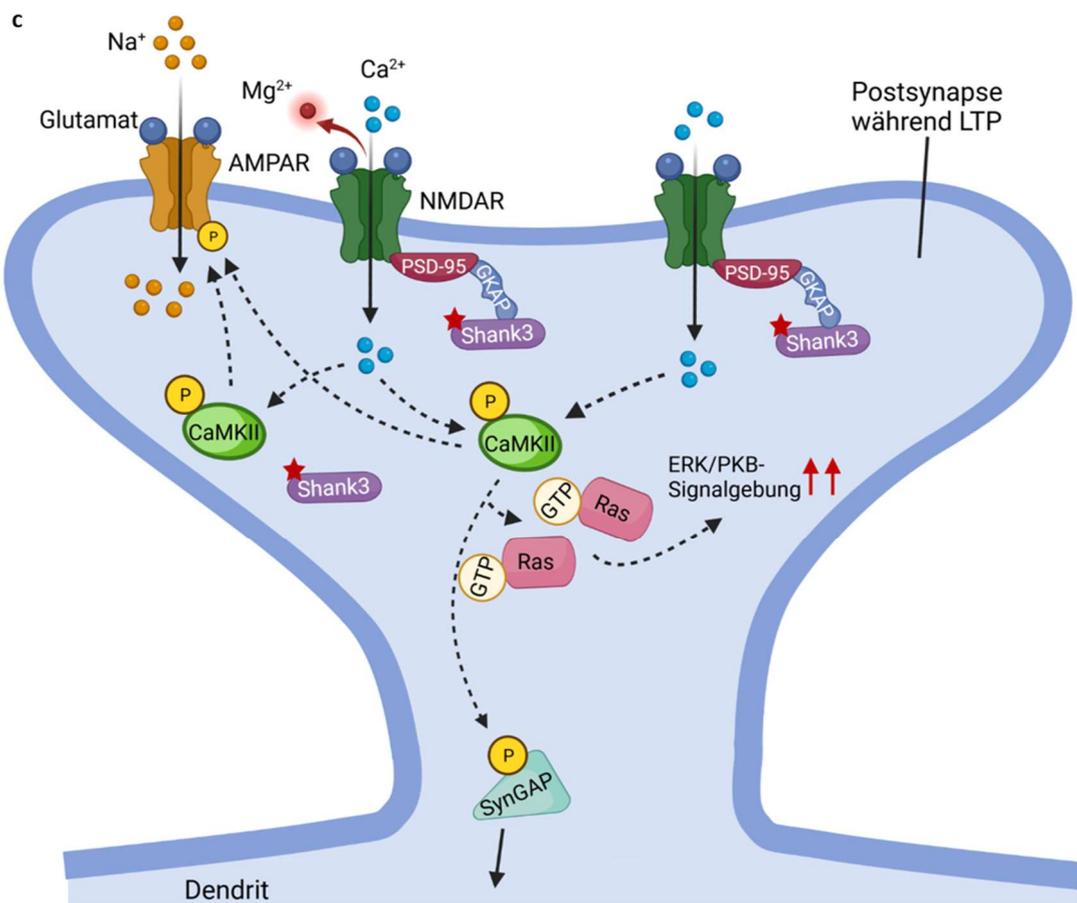
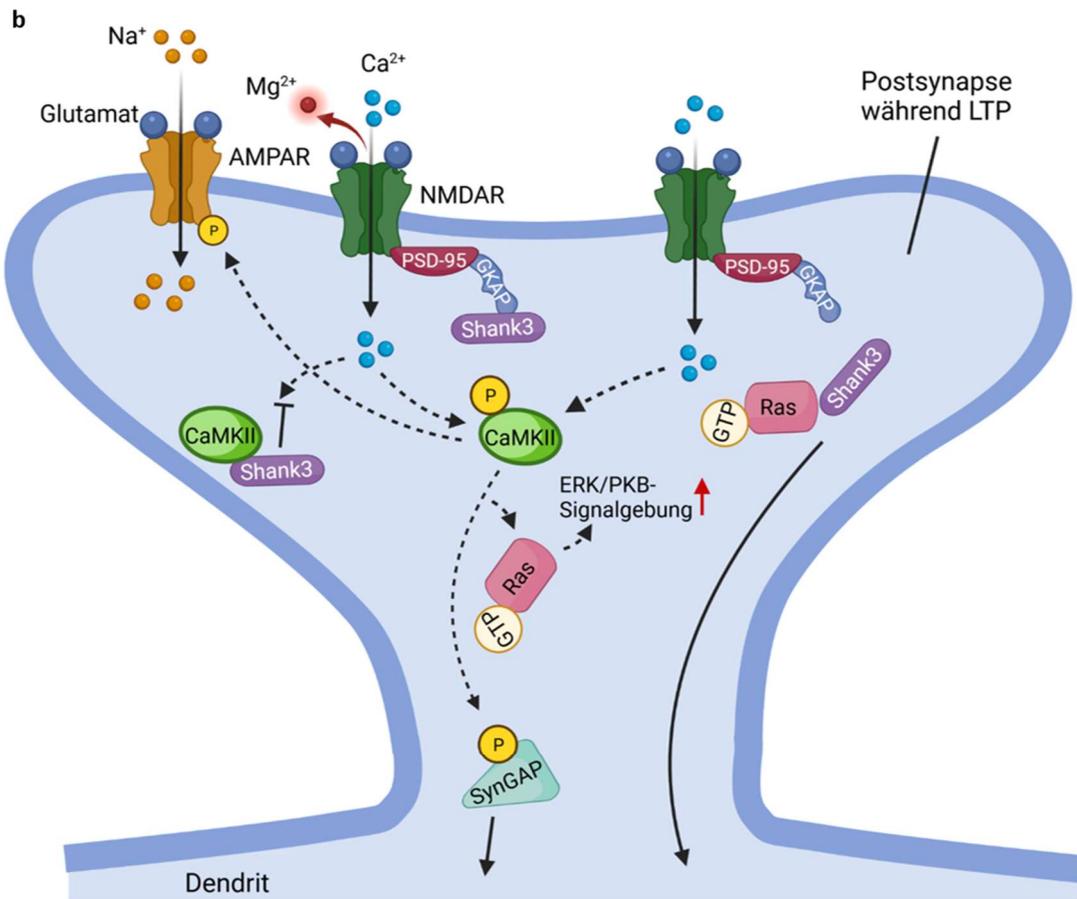
Zusätzlich zu der Rolle der Ras-Shank3-Interaktion in der Umstrukturierung der PSD kann Shank3 (analog zur CaMKII $\alpha$ -Interaktion) als negativer Regulator der Ras-abhängigen Signaltransduktion interpretiert werden. Demnach fängt Shank3 aktives Ras über die hochaffine Bindung an die SPN-Domäne ein und limitiert so die Verfügbarkeit des kleinen G-Proteins in der Synapse (Hassani Nia and Kreienkamp, 2018). Tatsächlich wurde bereits publiziert, dass sowohl Shank1 als auch Shank3 über die Bindung an das kleine G-Protein Rap1 die Integrin-Aktivierung inhibieren (Lilja *et al.*, 2017). Eine Störung der SPN-Ras-Interaktion durch zum Beispiel ASS-assoziierte Mutationen wie L68P könnte somit ebenfalls mit der negativen Regulation des Ras *signalings* interferieren, sodass in Neuronen Ras-abhängige Signale überaktiviert werden. Übereinstimmend mit dieser Annahme resultierte der vollständige *knockout* des *SHANK3*-Gens in einer erhöhten Erk-Aktivierung im Striatum (Wang *et al.*, 2016). Tatsächlich weisen einige Publikationen aus den letzten Jahren darauf hin, dass eine hyperaktive Ras-Signalgebung in die Pathogenese von Autismus-Spektrum-Störungen involviert ist (Faridar *et al.*, 2014; Pucilowska *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2013). Ash *et al.* beobachteten beispielsweise im *MECP2*-Duplikationssyndrom-Mausmodell, das für die Erforschung von Autismus-Spektrum-Störungen

verwendet wird, eine verstärkte Ras-Erk-Signaltransduktion, deren pharmakologische Inhibierung abnormales Bewegungslernen sowie die übermäßige Stabilisierung dendritischer Dornen normalisierte (Ash *et al.*, 2021).

Basierend auf den zuvor diskutierten Aspekten lässt sich ein Modell entwickeln, das die Dreiecksbeziehung zwischen Shank3, der CaMKII $\alpha$  und Ras in der Synapse veranschaulicht (Abbildung 32). Im Zuge der Langzeitpotenzierung kommt es über den NMDA-Rezeptor zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Postsynapse, der zur Aktivierung der CaMKII führt. Das GTPase-aktivierende Protein SynGAP verlässt nach der Phosphorylierung durch die CaMKII die Postsynapse, sodass sich aktives Ras in der PSD ansammeln kann, welches intrazellulär verschiedene Signalwege induziert. Shank3 bindet über die SPN-Domäne an das aktive G-Protein und wird dadurch aus dem PSD-95/GKAP/Shank-Komplex herausgelöst, sodass eine Reorganisation der PSD ermöglicht wird. Gleichzeitig limitiert Shank3 über die Ras-Bindung dessen Verfügbarkeit in der Postsynapse. Darüber hinaus interagiert Shank3 über den N-Terminus mit der inaktiven CaMKII $\alpha$ -Isoform und inhibiert so deren weitere Aktivierung (Abbildung 32b). Shank3 wirkt demnach sowohl in seiner Funktion als negativer Regulator der CaMKII $\alpha$  bzw. Ras-vermittelten Signaltransduktion als auch über die Umstrukturierung der PSD der Übererregung der Postsynapse entgegen. *Missense*-Mutationen, die mit der inhibierenden Funktion von Shank3 im Hinblick auf die CaMKII $\alpha$  oder Ras interferieren, beeinträchtigen somit die Fähigkeit von Synapsen, auf eine Hyperaktivierung intrazellulärer Signalwege zu reagieren und verursachen so Synaptopathien wie Autismus-Spektrum-Störungen (Abbildung 32c).



**Abbildung 32: Modell der Dreiecksbeziehung zwischen Shank3, der CaMKII $\alpha$  und Ras in der Postsynapse.** (a) Die Postsynapse im Zuge der normalen synaptischen Transmission. Über die durch Glutamat stimulierten AMPA-Rezeptoren kommt es zu Einstrom von Na<sup>+</sup> und somit zur Depolarisation der postsynaptischen Membran. Der NMDA-Rezeptor wird hingegen durch Mg<sup>2+</sup> blockiert. (b) Siehe nächste Seite. Die Postsynapse während der NMDA-Rezeptor-abhängigen Langzeitpotenzierung. Wiederholte bzw. verstärkte Depolarisation führt zu der Dissoziation von Mg<sup>2+</sup> vom NMDA-Rezeptor, sodass ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Postsynapse stattfindet, der in einer Aktivierung der CaMKII resultiert. Die aktivierte CaMKII phosphoryliert daraufhin unter anderem die GluR1-Untereinheit der AMPA-Rezeptoren und erhöht so deren Ionendurchlässigkeit. (c) Siehe nächste Seite. Mutationen in der N-terminalen Region von Shank3 (dargestellt durch rotes Sternsymbol) führen zum Verlust der Shank3-Bindung an die inaktive CaMKII $\alpha$  und/oder an aktiviertes Ras und beeinträchtigen so die inhibierende Wirkung des Shank3-N-Terminus auf die CaMKII $\alpha$ /Ras-vermittelte postsynaptische Signaltransduktion. Die Abbildung wurde mit dem Programm BioRender erstellt.



### 4.3 Störungen der SPN-Ank-Tandemfaltung beeinträchtigen die Shank3-Clusterbildung

Durch die Kristallisation des Shank3-N-Terminus wurde bereits gezeigt, dass die SPN-Domäne sich in einem engen intramolekularen Kontakt mit den Ankyrin Wiederholungen befindet, sodass die beiden Domänen eine Tandemstruktur ausbilden (Lilja *et al.*, 2017). Die physiologische Funktion dieser spezifischen SPN-Ank-Faltung konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden. Die Daten meiner Arbeit deuten darauf hin, dass der Shank3-N-Terminus über die Bindung an wichtige intrazelluläre Signalproteine entscheidend an der Regulation der postsynaptischen Signaltransduktion beteiligt ist. Eine wichtige Funktion der Tandemstruktur ist dabei die Bereitstellung einer Bindungsstelle für die CaMKII $\alpha$ . Mutationen, die die geschlossene Konformation des Shank3-N-Terminus aufbrechen, können mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziiert werden. Um darüber hinaus die Bedeutung der partiellen Blockade der Ankyrin-Wiederholungen durch die SPN-Domäne für die Normalfunktion unseres Nervensystems aufzuklären, analysierte ich verschiedene N-terminale Deletionskonstrukte sowie *missense*-Mutanten in hippocampalen Neuronen.

Die Deletion des gesamten Shank3-N-Terminus ( $\Delta$ SPN+Ank) führte im Vergleich zu dem Protein voller Länge weder im Hinblick auf die postsynaptische Lokalisation von Shank3 noch bezüglich der Morphologie der dendritischen Dornen zu erheblichen Veränderungen. Dieses Ergebnis stimmte dabei mit unseren älteren Daten überein (Hassani Nia *et al.*, 2020b). Auch im Gehirn existieren Shank3-Isoformen, die das N-terminale SPN-Ank-Fragment nicht beinhalten. Für die Shank3-Isoform 3c (PDZ-Domäne bis einschließlich SAM-Domäne) wurde zudem eine mit dem vollständigen Protein vergleichbare Lokalisation in dendritischen Dornen beobachtet (Wang *et al.*, 2014), sodass angenommen werden kann, dass weder das SPN-Ank-Modul noch die C-terminal-angrenzende SH3-Domäne für das postsynaptische *targeting* von Shank3 benötigt werden.

Interessanterweise existiert keine Shank3-Isoform, welche die Ankyrin-Wiederholungen, aber nicht die SPN-Domäne, enthält. Tatsächlich ergab die Analyse des  $\Delta$ SPN-Konstruktes einen beträchtlich abweichenden Phänotyp in Neuronen. Die Deletion der SPN-Domäne mündete in einer geringeren Dichte an Shank3-Clustern. Diese waren vermehrt auf dem dendritischen Schaft, und nicht um den Dendriten herum in dendritischen Dornen, lokalisiert. Darüber hinaus bildeten mit dem  $\Delta$ SPN-Konstrukt-transfizierte Neuronen einige deformierte, äußerst lange dendritische Dornen aus, die in ähnlicher Form bereits für die N52R-Mutation beobachtet worden waren (Salomaa *et al.*, 2021). Tatsächlich zeigen meine Daten einen sehr vergleichbaren Phänotyp für das  $\Delta$ SPN-Konstrukt und die N52R-Mutation, die spezifisch dafür geplant wurde, die SPN-Ank-Interaktion zu unterbrechen. Die Vermutung liegt nahe, dass die N52R-Mutation durch die räumliche Separation der N-terminalen Domänen analog zu dem  $\Delta$ SPN-Konstrukt zu freien Ankyrin-Wiederholungen führt, die als Ausgangspunkt für das beobachtete irreguläre Shank3-Clustering fungieren. Meine Analyse verschiedener N-terminaler Shank3-Varianten in HEK293T-Zellen zeigen zudem, dass freie Ank-Domänen intermolekular interagieren und Proteincluster bilden, während die Abschirmung der Ank-Wiederholungen durch die SPN-Domäne diese Ank-Ank-Interaktionen mehrheitlich verhindert. Basierend auf diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass freie Ankyrin *repeats* auch in Neuronen unkontrolliert miteinander interagieren und so zur vorzeitigen Shank3-Clusterbildung auf dem dendritischen Schaft führen. Eine wesentliche Funktion der SPN-Domäne innerhalb der SPN-Ank-Tandemfaltung besteht demnach in der Regulation des Ank-basierten Clusterings durch eine Verminderung der Ank-Ank-Interaktionen. Diese Theorie bietet des Weiteren einen möglichen Erklärungsansatz für die Beeinträchtigung der synaptischen Funktion durch die ASS-assoziierten *missense*-Mutationen L68P und P141A. Sowohl L68P (Bucher *et al.*, 2021) als auch P141A (Daten in dieser Arbeit) interferieren mit der postsynaptischen Lokalisation von Shank3 und führen zu einem relativen Anstieg von Clustern entlang des Dendriten. Beide Mutationen (wie auch N52R) resultieren

durch eine Störung des SPN-Ank-Kontakts in einer zumindest partiellen Freilegung der Ank-Domäne, die in der Konsequenz die unkontrollierte Clusterbildung auf dem dendritischen Schaft begünstigt. Im Gegensatz zu der artifiziellen N52R-Mutation verändern L68P und P141A die Morphologie der dendritischen Dornen im Vergleich zum WT nicht. Ein möglicher Erklärungsansatz für das Auftreten längerer Dornen im Falle von N52R könnte bei der Interaktion von N52R-Shank3 mit dem Aktin-Zytoskelett ansetzen. Salomaa et. al. postulierten, dass eine freie SPN-Domäne, die sich nicht im SPN-Ank-Tandem befindet, direkt an F-Aktin binden kann und dass die N52R-Mutation diese Interaktion drastisch verstärkt (Salomaa et al., 2021). Da angenommen wird, dass die Morphologie dendritischer Dornen zu einem wesentlichen Teil durch das Aktin-Zytoskelett bestimmt wird, kann vermutet werden, dass die N52R-bedingte (verstärkte) Aktin-Shank3-Interaktion mit der regulären Formation des Aktin-Netzwerkes interferiert. Dahingegen zeigen unpublizierte Daten der AG Kreienkamp, dass L68P und P141A nicht zu einer verstärkten Aktin-Bindung beitragen. Allerdings liefert dieser Ansatz keine Erklärung für das Auftreten von abnormal langen dendritischen Dornen im Falle des  $\Delta$ SPN-Konstruktes, auch wenn berücksichtigt werden sollte, dass lange *spines* weit häufiger für das N52R-Konstrukt gefunden werden konnten (Salomaa et al., 2021). Hier mag spekuliert werden, dass für das  $\Delta$ SPN-Konstrukt zwar keine direkte Aktin-Interaktion über die SPN-Domäne erfolgen kann, jedoch könnten die freien Ank-Wiederholungen über eine verstärkte Fodrin-Bindung indirekt an der Modulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sein. Auch L68P und P141A führen über die Freilegung der Ank-Domäne zu einer verstärkten Fodrin-Interaktion, die allerdings weniger stark ausfällt als für die vollständig isolierten Ank-Wiederholungen. Ausgehend von meinen Daten kann ein neuer Pathomechanismus für die Entstehung von Autismus-Spektrum-Störungen abgeleitet werden: Die Freilegung der Ank *repeats*, beispielsweise durch einen mutationsbedingten Verlust der abschirmenden Wirkung der SPN-Domäne, ermöglicht intermolekulare Ank-Ank-Interaktionen, welche die Shank3-Synapsenbildung beeinträchtigen.

Die Vermutung, dass diesem neuen Mechanismus des Shank3-Clusterings nicht nur einfache Ank-Ank-Interaktionen unterliegen, sondern dass eine unkontrollierte Ank-basierte Polymerisierung zu der vorzeitigen Ausbildung der Shank3-Clusterstrukturen auf dem dendritischen Schaft führt, konnte zumindest *in vitro* nicht bestätigt werden. Die massenphotometrische Analyse des His-SUMO-Ank-Fusionsproteins ergab keine Anzeichen für eine Oligomerisierung, die über die Bildung von Dimer- bzw. potenziellen Trimerstrukturen hinausgeht. Allerdings sollte zum einen berücksichtigt werden, dass die Ank-Domäne mit His-SUMO-*tag* untersucht wurde, da die Methode der Massen-Photometrie am CSSB auf Proteine mit einem Molekulargewicht von über 50 kDa ausgelegt ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der *tag* mit einer potenziellen Polymerisierung der Ank-Domäne interferiert. Zum anderen ist nicht sicher, ob die rekombinant hergestellte Ank-Domäne isoliert ohne die SPN-Domäne tatsächlich in Lösung die richtige Faltung einnimmt. Eine Möglichkeit würde darin bestehen, den gesamten Shank3-N-Terminus als His-SUMO-Fusionsprotein herzustellen und anschließend nach der korrekten Faltung des Proteins sowohl den *tag* als auch die SPN-Domäne proteolytisch abzuspalten, um dann die Ank-Wiederholungen im Hinblick auf eine potenzielle Polymerisierung mittels Elektronenmikroskopie zu analysieren.

## 4.4 *Missense*-Mutationen in den Schlüssel­domänen beeinträchtigen die synaptische Funktion von Shank2 auf unterschiedliche Weise

### 4.4.1 G643R und L1800W setzen die postsynaptische Lokalisation von Shank2 herab

Shank-Proteine verbinden in der Postsynapse mithilfe ihrer Proteininteraktionsdomänen Glutamat­rezeptoren mit dem Aktin-Zytoskelett. Als Schlüssel­domänen für den Aufbau der postsynaptischen Dichte fungieren dabei die PDZ-Domäne sowie die SAM-Domäne. Die PDZ-Domäne vermittelt die Bindung an GKAP und integriert Shank somit in den aus PSD-95, GKAP und Shank bestehenden PSD-Kernkomplex (Boeckers *et al.*, 1999; Naisbitt *et al.*, 1999). Die  $Zn^{2+}$ -abhängige Multimerisierung der Shank2- und Shank3-SAM-Domänen ermöglicht zusätzlich die Verknüpfung multipler Shank-assoziiertes Proteinkomplexe und bildet so ein Grundgerüst für den Aufbau der postsynaptischen Dichte (Baron *et al.*, 2006). *Missense*-Mutationen in allen drei *SHANK*-Genen sind mit neurologischen Entwicklungsstörungen assoziiert (Durand *et al.*, 2007; Homann *et al.*, 2016; Peykov *et al.*, 2015). Erstaunlicherweise wurde dabei aber noch keine *missense*-Mutation publiziert, welche die Funktion der PDZ- oder der SAM-Domäne einschränkt. Neue Arbeiten der AG Kreienkamp identifizierten erstmalig Patienten mit *missense*-Mutationen in den Schlüssel­domänen von Shank2, die mit den molekularen Interaktionen des postsynaptischen Proteins interferieren (Daten noch nicht publiziert). Die G643R-Mutation verändert die Konformation der GKAP-Bindungsfurche erheblich und senkt so die Bindungsaffinität um das 70-fache. Die L1800W-Mutation interferiert hingegen mit der SAM-Oligomerisierung. Beide *missense*-Mutationen verursachen einen schwerwiegenden neuropsychiatrischen Phänotyp, der jeweils mit einer geistigen Behinderung des Patienten einhergeht.

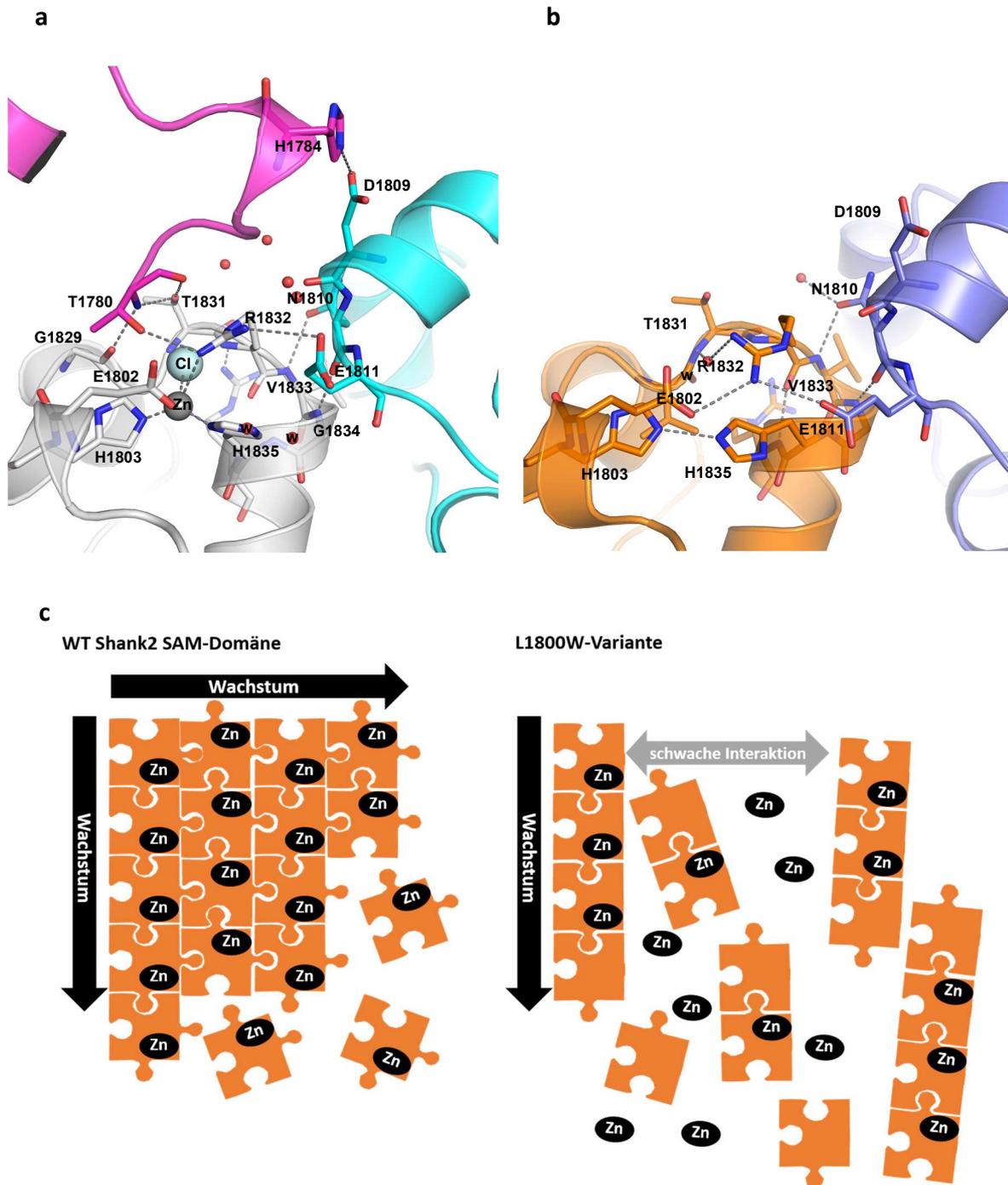
Um mögliche Effekte der *missense*-Mutationen G643R und L1800W auf die synaptische Funktion von Shank2 zu untersuchen, führte ich eine umfangreiche Analyse der beiden Mutanten in hippocampalen Rattenneuronen durch. Dabei wurde die Expression des endogenen *SHANK2* der Ratte mit einer *SHANK2*-shRNA effizient herunterreguliert, sodass eine Überrepräsentation von Shank2 vermieden wurde. Durch die Expression der Shank2-Mutanten wird dementsprechend jeweils das Vorliegen einer homozygoten Mutation nachgeahmt, auch wenn *SHANK*-Mutationen bei Patienten generell heterozygot vorliegen. Allerdings ermöglicht dieser Ansatz die Analyse eines verstärkten Phänotyps, sodass kleine Unterschiede zwischen dem WT und den Mutanten auf neuronaler Ebene besser entschlüsselt werden können.

Keine der beiden Mutationen wirkte sich sichtbar auf die Morphologie der transfizierten Neuronen aus. Weder im Hinblick auf die dendritische Komplexität noch in Bezug auf die Länge der dendritischen Dornen wichen die Mutanten erheblich vom WT ab. Allerdings konnte ich für beide Mutationen eine Beeinträchtigung des postsynaptischen *targetings* von Shank2 beobachten: Die mutierten Shank-Proteine akkumulierten verstärkt auf dem dendritischen Schaft und weniger stark in den dendritischen Dornen. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen für die L1800W-Variante, da diese Mutation mit der Funktion der SAM-Domäne interferiert, die als Teil einer C-terminalen Signalsequenz das synaptische *targeting* von Shank2 (und Shank3) vermittelt (Boeckers *et al.*, 2005). Die verringerte Lokalisation der G643R-Mutante in dendritischen Dornen deutet zudem darauf hin, dass analog zu Shank1 auch für Shank2 eine intakte PDZ-Domäne, und somit die Interaktion mit GKAP, für ein effizientes synaptisches *targeting* erforderlich ist (Sala *et al.*, 2001). Während die Unterschiede im postsynaptischen *targeting* in der unbehandelten Neuronenkultur eher moderat ausfielen, führte eine Langzeitbehandlung der transfizierten Neuronen mit  $Zn^{2+}$  über 3,5 Tage insbesondere für die L1800W-Variante zu verstärkten Abweichungen von der WT-Kondition.

$Zn^{2+}$  ist ein essenzielles Spurenelement, das für die Normalfunktion des Gehirns benötigt wird (Gower-Winter and Levenson, 2012). Innerhalb des Gehirns liegt  $Zn^{2+}$  überwiegend als katalytischer Kofaktor oder als strukturelles Element von  $Zn^{2+}$ -bindenden Proteinen vor; nur zu einem geringen Anteil von

circa 10% tritt das Spurenelement als freies  $Zn^{2+}$  auf (Pérez-Clausell and Danscher, 1985). Freies  $Zn^{2+}$  wird im Gehirn häufig auch als synaptisches  $Zn^{2+}$  bezeichnet, da dieses in den synaptischen Vesikeln einiger glutamaterger Neuronen transportiert wird. Durch die Freisetzung des synaptischen  $Zn^{2+}$  im Zuge der neuronalen Aktivierung kann die  $Zn^{2+}$ -Konzentration auf bis zu 10  $\mu M$  ansteigen (Frederickson *et al.*, 2006). Freigesetztes  $Zn^{2+}$  bindet an  $Zn^{2+}$ -Transporter oder Glutamatrezeptoren und/oder strömt in die Postsynapse ein, wo  $Zn^{2+}$  überwiegend an synaptische Proteine (wie Shank) bindet und so wesentlich an der Bildung sowie der Erhaltung der postsynaptischen Dichte beteiligt ist (Assaf and Chung, 1984; Besser *et al.*, 2009; Jan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001).  $Zn^{2+}$  spielt somit eine wichtige Rolle für die synaptische Transmission und die synaptische Plastizität (McAllister and Dyck, 2017; Pérez-Clausell and Danscher, 1985). Es wurde bereits gezeigt, dass  $Zn^{2+}$  die Rekrutierung von Shank2 und Shank3 in die postsynaptische Dichte verstärkt (A. M. Grabrucker *et al.*, 2011; Tao-Cheng *et al.*, 2016). In unseren Neuronenkulturen wird bei einer Konzentration von  $Zn^{2+}$  im niedrigen mikromolaren Bereich endogenes genau wie überexprimiertes Shank2 erfolgreich in die Synapsen transportiert, wo es zur Ausbildung von Proteinclustern kommt. Eine Erhöhung der  $Zn^{2+}$ -Konzentration um 10  $\mu M$  führte darüber hinaus für den WT und die G643R-Variante zu einem zusätzlichen Anstieg der Dichte postsynaptischer Shank2-Cluster, während für die L1800W-Mutante dieser Effekt ausblieb. Dieses Ergebnis bestätigt, dass  $Zn^{2+}$  Shank2 über die Multimerisierung der SAM-Domäne in der PSD stabilisiert. Es ist anzunehmen, dass die L1800W-Mutation durch die Beeinträchtigung der  $Zn^{2+}$ -abhängigen Polymerisierung der SAM-Domäne die Bildung funktioneller Synapsen erschwert. In diesem Fall kann  $Zn^{2+}$  nach der Freisetzung aus präsynaptischen Vesikeln in der Postsynapse noch an die SAM-Domäne von Shank3 binden und deren Polymerisierung in helikale Fibrillen induzieren. Durch die Ausbildung intra- sowie interhelikaler Kontakte entstehen große *sheets* dieser Fibrillen, die in den tieferen Schichten das Grundgerüst der PSD ausmachen. Die  $Zn^{2+}$ -Bindungsstelle der Shank2-SAM-Domäne wird durch die L1800W-Mutation gemäß der 3D-Struktur so verändert, dass keine interhelikalen Kontakte mehr ausgebildet werden können, wodurch die Polymerisierung von Shank2 immens verlangsamt wird (Abbildung 33). Der Aufbau sowie die Remodellierung der PSD werden dementsprechend eingeschränkt.

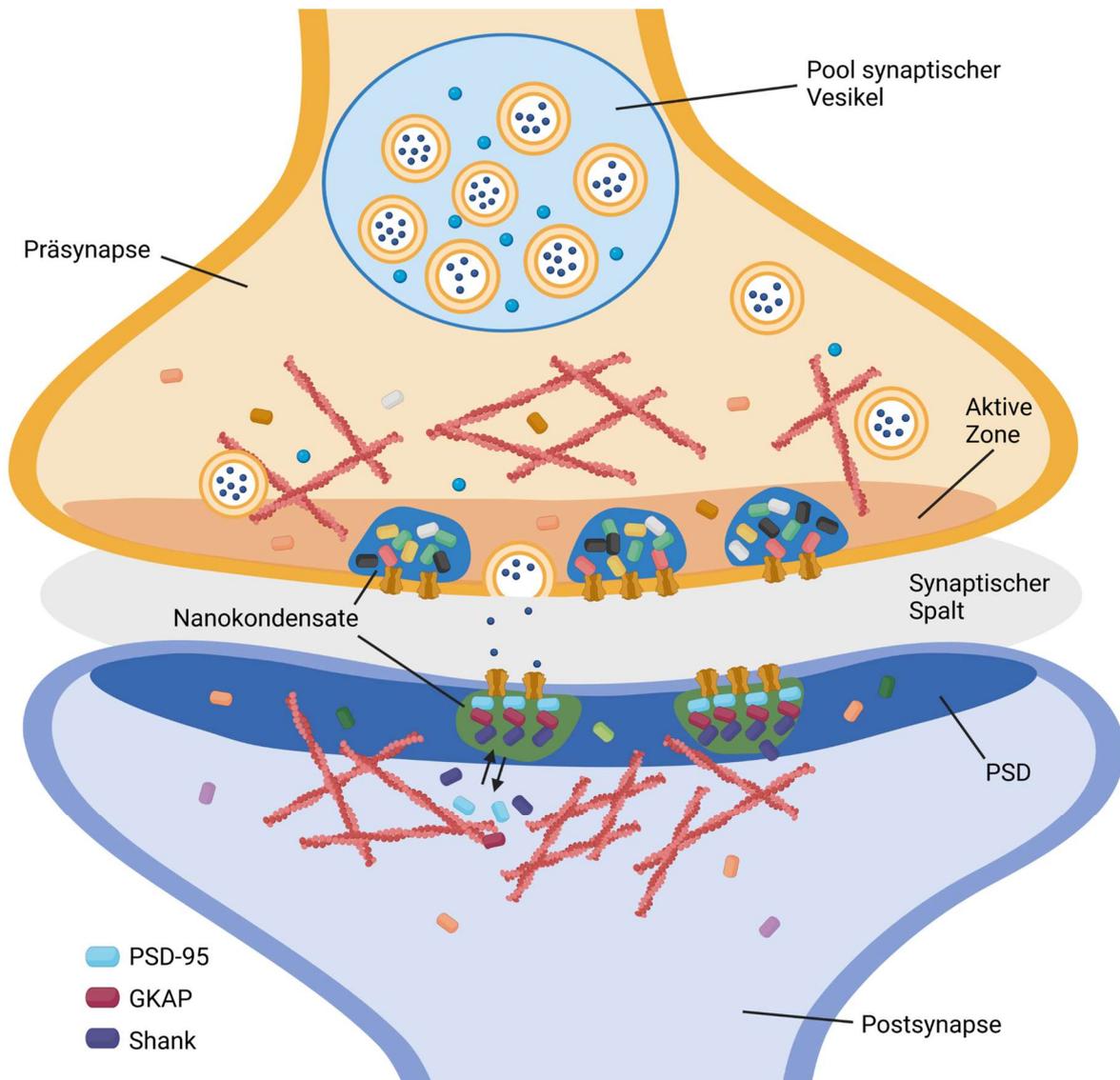
Interessanterweise kann eine  $Zn^{2+}$ -Defizienz im Mausgehirn, die zu einer erheblichen Reduzierung der Proteinmengen von Shank2 und Shank3 an der Postsynapse führt, mit ASS-ähnlichem Verhalten sowie kognitiven Beeinträchtigungen assoziiert werden (Grabrucker *et al.*, 2016, 2014). Zudem zeigte die Analyse des  $Zn^{2+}$ -Gehalts im Serum autistischer Patienten mit Phelan-McDermid-Syndrom (heterozygoter Verlust eines *SHANK3*-Allels), dass eine  $Zn^{2+}$ -Insuffizienz mit dem vermehrten Auftreten von Anfällen, Aufmerksamkeits- und Hyperaktivitätsstörungen sowie Muskelhypotonie verknüpft ist, sodass vermutet wurde, dass eine  $Zn^{2+}$ -Therapie den Phänotyp autistischer Patienten abmildern könnte (Grabrucker *et al.*, 2014). Auch wenn aus dieser Studie nicht eindeutig hervorgeht, ob ein  $Zn^{2+}$ -Mangel tatsächlich den autistischen Phänotyp mitverursacht oder ob dieser Mangel nur eine Konsequenz der Autismus-Pathogenese darstellt, könnte eine  $Zn^{2+}$ -Therapie auch für den Patienten mit der L1800W-Mutation in *SHANK2* in Betracht gezogen werden, um potenziell durch die Erhöhung der  $Zn^{2+}$ -Konzentration im Gehirn die postsynaptische Stabilität zu stärken.



**Abbildung 33: Die L1800W-Mutation erschwert die  $Zn^{2+}$ -abhängige Polymerisierung der SAM-Domäne.** Darstellung der intra- und interhelikalen Interaktionen der Shank2-SAM-Domäne für den WT (**a**) und die L1800W-Variante (**b**) in der 3D-Struktur. Das SAM-WT-Monomer ist in Grau abgebildet und bildet intra- (cyan) und interhelikale (magenta) Kontakte aus. Für die Mutante (orange) liegt nur ein intrahelikaler Kontakt (blau) vor. Die Kristallstruktur der SAM-Domäne wurde von Isabel Bento (DESY, Hamburg) aufgeklärt. (**c**) Modell der verlangsamten SAM-Polymerisierung der L1800W-Mutante.  $Zn^{2+}$  stabilisiert die intra- und interhelikalen Kontakte der WT-SAM-Domäne. Bei einer ausreichenden  $Zn^{2+}$ -Konzentration wachsen die helikalen *sheets* demnach in zwei Dimensionen. Die L1800W-Mutation verringert die  $Zn^{2+}$ -Affinität der SAM-Domäne, sodass diese weniger effektiv in die helikalen Fibrillen eingebaut wird. Darüber hinaus werden die interhelikalen Kontakte signifikant eingeschränkt. Somit können große SAM-Domänen-Cluster erst entstehen, wenn ausreichend lange Helices vorgeformt wurden. Das Modell wurde von Hans-Jürgen Kreienkamp erstellt.

#### 4.4.2 G643R und L1800W verändern die Nanoclusterorganisation der PSD

Die postsynaptische Dichte wurde zuerst als eine elektronenreiche Verdickung unterhalb der postsynaptischen Membran beschrieben. Sie besteht aus zahlreichen Proteinen, die scheibenförmige Molekülverbände einer Breite von mehreren hundert Nanometern ausbilden (Cohen *et al.*, 1977; Harris and Weinberg, 2012; Palay, 1956). Die PSD schließt dabei mit einer Seite direkt an die Plasmamembran an. Die andere Seite ragt in das Zytosol des dendritischen Dorns hinein, sodass die PSD ein kondensiertes, subzelluläres Kompartiment darstellt, welches nicht vollständig von einer Lipidmembran umgeben ist (Okabe, 2007). Durch die Anwendung hochauflösender Mikroskopietechniken wurde in neueren Studien gezeigt, dass der PSD-Kernkomplex (PSD-95/GKAP/Shank) zusammen mit weiteren direkten sowie indirekten postsynaptischen Interaktionspartnern innerhalb der Synapse in sogenannten Nanoclustern (Durchmesser  $\approx 80$  nm) konzentriert vorliegt (Abbildung 34) (Hruska *et al.*, 2018; MacGillavry *et al.*, 2013).

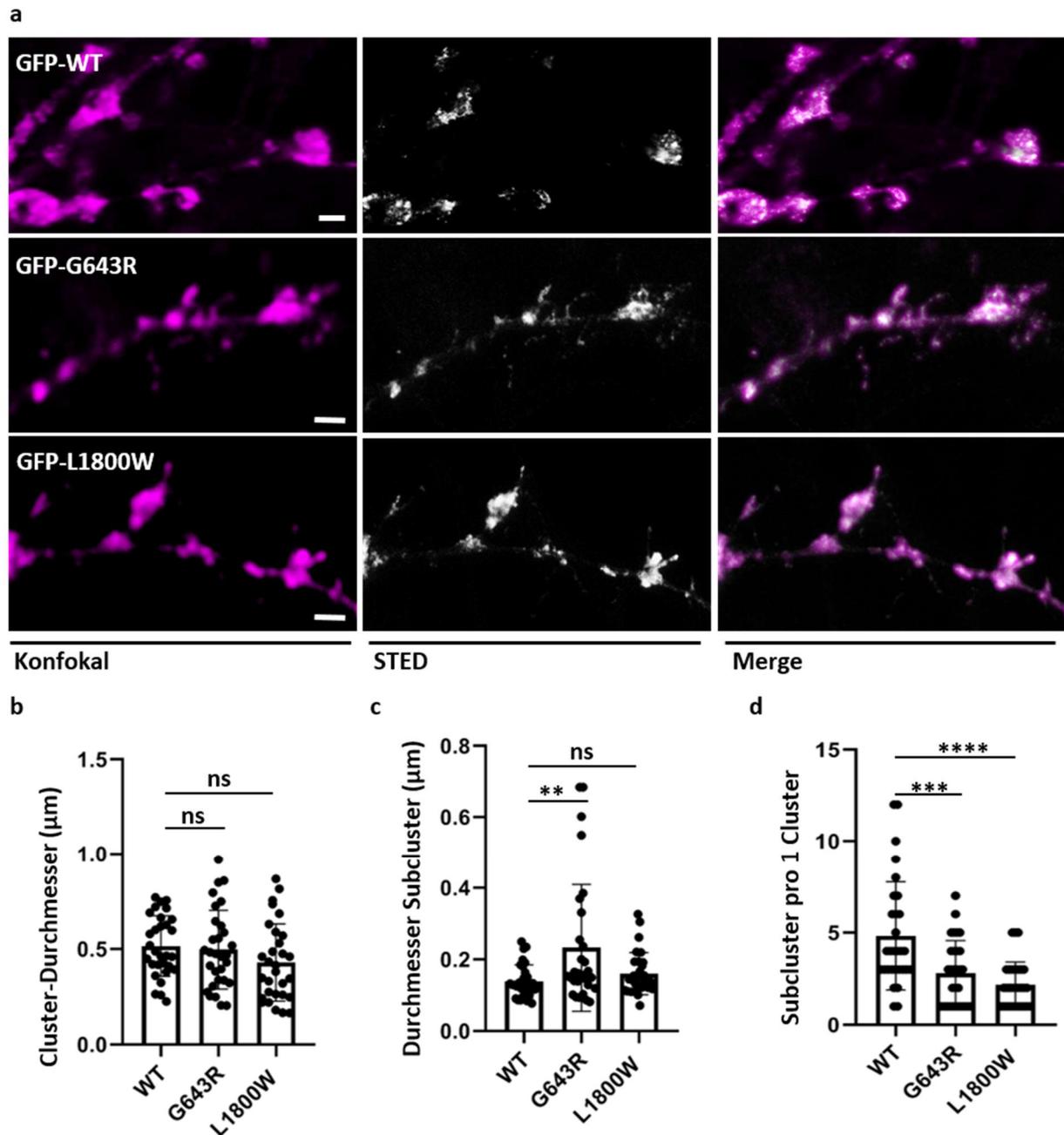


**Abbildung 34: Liquid-liquid phase separation an der Synapse.** Neuere Studien gehen davon aus, dass sowohl in der aktiven Zone präsynaptischer Enden als auch in der postsynaptischen Dichte über Phasenseparation Protein-Nanokondensate gebildet werden. Der PSD-Kernkomplex bestehend aus PSD-95, GKAP und Shank scheint dabei das Gerüst der postsynaptischen Nanocluster zu bilden. Die Proteine befinden sich im konstanten Austausch zwischen Kondensat und wässriger Umgebung. Darüber hinaus wird vermutet, dass auch der Pool synaptischer Vesikel über Phasenseparation in der Präsynapse kondensiert. Für diese Abbildung wurde sich an Chen *et al.* (2020) orientiert. Die Abbildung wurde mit dem Programm BioRender erstellt.

Voraussichtlich hilft die Bildung dieser Nanocluster dabei, den präsynaptischen Apparat zur Freisetzung von Glutamat direkt gegenüber zu den postsynaptischen Rezeptorkomplexen zu positionieren. Dies verbessert vermutlich die Effizienz der synaptischen Transmission. Allerdings ist bisher unklar, welche Mechanismen der Bildung und Ausrichtung dieser Nanocluster unterliegen. Neue *in vitro*-Daten deuten jedoch darauf hin, dass Interaktionen zwischen den Gerüstproteinen PSD-95, GKAP, Shank und Homer zu einer *liquid-liquid phase separation* (LLPS) führen und so die Bildung von Nanodomänen innerhalb der Synapse ermöglichen (Zeng *et al.*, 2018). Als LLPS wird ein Mechanismus bezeichnet, der die Bildung membranloser Kompartimente beschreibt. Hierbei kondensieren biologische Makromoleküle wie z.B. Proteine innerhalb einer wässrigen Phase, da diese in der kondensierten Phase über Interaktionen untereinander energetisch stabiler existieren können als in der verdünnten Phase. Im Gegensatz zu der Bildung von Proteinaggregaten behalten die Proteine ihre native physiologische Konformation sowie Funktion, während sie sich im konstanten Austausch zwischen dem Kondensat und der wässrigen Umgebung (dem Cytosol) befinden (Banani *et al.*, 2017; Hyman *et al.*, 2014).

Um zu untersuchen, ob die *missense*-Mutationen in den Shank2-Schlüsseldomänen sich auf die Bildung post- oder präsynaptischer Nanocluster auswirken, analysierte ich mittels hochauflösender STED-Mikroskopie die *nanoscale*-Organisation von vGlut und PSD-95 in den hippocampalen Neuronen, die mit den mutierten *SHANK2*-Varianten transfiziert worden waren. Da kein Einfluss der Mutanten auf Größe oder Anzahl der vGlut-Subcluster festgestellt werden konnte, kann angenommen werden, dass beide Mutationen sich nicht auf das *nano-clustering* an präsynaptischen Terminalen auswirken. Dagegen beeinträchtigten G643R und L1800W nicht nur das postsynaptische *targeting* von Shank2, sondern interferierten auch mit der Nanoclusterorganisation von PSD-95 in der Postsynapse. Dabei ist es höchst interessant, dass die für PSD-95 detektierten Unterschiede im Hinblick auf die Größe und Anzahl der Subcluster in der gleichen Tendenz auch für das Shank2-Protein selbst gefunden werden konnten (Hassani Nia, unpublizierte Daten, Abbildung 35). Diese Ergebnisse sprechen zusammen genommen dafür, dass die PDZ-vermittelte Interaktion mit GKAP ebenso wie die SAM-vermittelte Polymerisierung von Shank2 wichtige Prozesse für die Bildung der postsynaptischen Nanocluster darstellen, die in den Patienten mit der G643R- bzw. der L1800W-Mutation gestört werden. Wahrscheinlich werden die postsynaptischen Proteine (unter anderem) durch diese Interaktionen in enge räumliche Nähe zueinander gebracht, sodass dann über intrinsisch ungeordnete Proteinsegmente wie beispielsweise die Prolin-reiche Region der Shank-Proteine die eigentliche Phasentransition vorangetrieben werden kann, die in der Konsequenz zur Ausbildung dichter Nanoclusterstrukturen führt (Feng *et al.*, 2019; Mollieux *et al.*, 2015). Durch die beeinträchtigte GKAP-Shank2- (G643R) bzw. Shank2-Shank2-Interaktion (L1800W) finden die postsynaptischen Proteine nicht mehr so effektiv zueinander, sodass für die beiden Mutanten innerhalb eines Mikroclusters weniger postsynaptische Nanocluster gebildet werden. Innerhalb des PSD-Kernkomplexes ist Shank indirekt über GKAP mit PSD-95 verbunden. Der Wegfall der Shank2-GKAP-Bindung durch die G643R - Mutation schränkt die Bildung dieses Kernkomplexes ein und führt neben der Verringerung der Anzahl der postsynaptischen Nanocluster auch zur Ausbildung größerer Subclusterstrukturen. Es kann somit angenommen werden, dass die G643R-Variante besonders mit der Verdichtung der postsynaptischen Cluster durch *liquid-liquid phase separation* interferiert. Da die richtige Positionierung prä- und postsynaptischer Nanocluster essenziell für die synaptische Transmission zu sein scheint, liegt die Vermutung nahe, dass beide *SHANK2-missense*-Mutationen die Signalübertragung an Synapsen abschwächen. Der starke neuropsychiatrische Phänotyp, der durch die beiden Mutationen hervorgerufen wird, deutet in jedem Fall darauf hin, dass Veränderungen in der postsynaptischen Dichte auf Nanoebene drastische Auswirkungen auf die Funktion des Nervensystems und somit auf die mentale Gesundheit haben können. Eine *nonsense*-Mutation, die vermutlich einen heterozygoten Verlust von *SHANK2* hervorruft, führt im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten *missense*-

Varianten zu einem weitaus milderem Phänotyp mit einer leichten Intelligenzminderung (Doddato *et al.*, 2022). Dies lässt vermuten, dass der heterozygote Verlust von *SHANK2* in Teilen durch Shank1 und Shank3 kompensiert wird. Die Shank2-*missense*-Varianten werden zwar größtenteils in die Synapsen transportiert, blockieren so aber eine effektivere Kompensationsreaktion und beeinträchtigen die Nanoclusterorganisation der PSD entscheidend.



**Abbildung 35: Missense-Mutationen verändern die Nanocluster-Organisation von Shank2 in der PSD.** (a) Hippocampale Rattenneuronen wurden mit GFP-*SHANK2*-Varianten und einem *Shank2*-shRNA-Vektor kotransfiziert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Shank2-Cluster wurden entlang der Dendriten mit konfokaler Mikroskopie ausgewählt und mittels 2D-STED-Mikroskopie in Subclusterstrukturen aufgelöst (Skalierungsbalken 1 µm). (b-d) Quantitative Analyse der Shank2 Cluster- und Subclusterstrukturen. Diese Abbildung wurde modifiziert von Fatemeh Hassani Nia übernommen.

## 4.5 Irreguläre Shank-Clusterbildung als mögliche Grundlage verschiedener Synaptopathien

Shank-Proteine nutzen verschiedene molekulare Mechanismen zur synaptischen Clusterbildung, u.a. die  $Zn^{2+}$ -abhängige Polymerisation der SAM-Domäne (Baron *et al.*, 2006), sowie die Vernetzung über die Bindung an Homer-Tetramere über die Prolin-reiche Region (Hayashi *et al.*, 2010). Interessanterweise betreffen krankheitsassoziierte Mutationen im *SHANK3*-Gen, die mit dem *clustering* in Neuronen interferieren, in der Regel weder die SAM-Domäne noch die Homer-Bindungsstelle, sondern häufig den N-terminalen Bereich von Shank3 bestehend aus der SPN-Domäne und den Ankyrin-Wiederholungen, dessen physiologische Funktion noch nicht vollends verstanden wurde (Bucher *et al.*, 2021; Durand *et al.*, 2012). Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte ich mit der ASS-assoziierten *missense*-Mutation P141A eine weitere Variante des Shank3-N-Terminus untersuchen, die das postsynaptische *targeting* von Shank3 beeinträchtigte. Die P141A-Variante führte vergleichbar mit der N52R- und der L68P-Mutation zu einer verringerten Dichte an postsynaptischen (also PSD-95-positiven) Clustern auf dendritischen Dornen. Meine Daten zeigen, dass alle drei Mutationen die SPN-Ank-Tandemfaltung erheblich stören und dadurch intermolekulare Ank-Ank-Interaktionen ermöglichen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führte die Deletion der SPN-Domäne in Bezug auf die Anzahl und Morphologie dendritischer Dornen zu einem drastisch veränderten neuronalen Phänotyp, sodass die Relevanz der Blockade der Ank-Wiederholungen durch die SPN-Domäne für die synaptische Funktion von Shank3 demonstriert wurde. Basierend auf diesen Erkenntnissen leite ich ab, dass die Ank-Ank-Interaktionen einen weiteren Mechanismus der Shank-Clusterbildung darstellen könnten. Dieser Mechanismus wird im Normalzustand von der SPN-Domäne reguliert, die innerhalb des SPN-Ank-Tandems intermolekulare Ank-Ank-Interaktionen signifikant abschwächt und so das vorzeitige *clustering* entlang des Dendriten verhindert. Der Beitrag dieser Art der Clusterbildung zur Normalfunktion von Shank3 bleibt zunächst unklar, da Shank3 auch ohne den gesamten N-Terminus postsynaptische Cluster bilden kann. Aber eine unregulierte Ank-Ank-Interaktion scheint entscheidend an der Ausprägung von Autismus-Spektrum-Störungen mitzuwirken.

Die im Zuge dieser Arbeit untersuchten *SHANK2*-*missense*-Mutationen G643R und L1800W betreffen hingegen die funktionellen Schlüssel-domänen von Shank, die PDZ-Domäne bzw. die SAM-Domäne, und beeinträchtigen deren molekulare Interaktionen drastisch. Erstaunlicherweise zeigten beide Mutationen einen weitaus weniger starken neuronalen Phänotyp im Vergleich zu der N52R-Variante oder dem  $\Delta$ SPN-Konstrukt im Falle von Shank3. Während eine vollständig freie Ank-Domäne einen neuen *clustering* Mechanismus vermittelt und die Morphologie dendritischer Dornen erheblich verändert, zeigen die Shank2-Varianten vorrangig erst auf nanoskopischer Ebene starke Effekte auf die Shank-Clusterbildung. Beide Shank2-Mutanten werden, wenn auch in abgeschwächter Form, in die Postsynapse geleitet, in der beide Varianten dann durch den Verlust zentraler molekularer Interaktionen mit der Bildung postsynaptischer Nanocluster interferieren. Dieses Ergebnis demonstriert die Relevanz der regulären Ausbildung des PSD-Kernkomplexes sowie der SAM-vermittelten Shank-Polymerisierung für die *nanoscale*-Organisation in der PSD. Die Störung dieser Nanoorganisation durch G643R und L1800W führt demnach bei den Patienten zu schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörungen gekennzeichnet durch geistige Behinderung, Autismus, Epilepsie oder globale Entwicklungsverzögerung. Nach meinem Kenntnisstand konnten hier somit erstmalig mutationsbedingte Veränderungen in der Organisation der Nanocluster der postsynaptischen Dichte mit einer Störung der mentalen Gesundheit in Verbindung gebracht werden. Die Analyse der Shank-Clusterbildung auf Mikro- sowie Nanoebene kann demzufolge maßgeblich zur Aufklärung der Pathomechanismen SHANK-assoziiierter Synaptopathien beitragen.

## Literaturverzeichnis

- Adegbola, A., Lutz, R., Nikkola, E., Strom, S.P., Picker, J., Wynshaw-Boris, A., 2020. Disruption of CTNND2, encoding delta-catenin, causes a penetrant attention deficit disorder and myopia. *Hum. Genet. Genomics Adv.* 1, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2020.100007>
- Alberini, C.M., 2009. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.* 89, 121–145. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>
- Alonso-Gonzalez, A., Rodriguez-Fontenla, C., Carracedo, A., 2018. De novo mutations (DNMs) in autism spectrum disorder (ASD): Pathway and network analysis. *Front. Genet.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00406>
- Araki, Y., Zeng, M., Zhang, M., Haganir, R.L., 2015. Rapid Dispersion of SynGAP from Synaptic Spines Triggers AMPA Receptor Insertion and Spine Enlargement during LTP. *Neuron* 85, 173–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.023>
- Arons, M.H., Lee, K., Thynne, C.J., Kim, S.A., Schob, C., Kindler, S., Montgomery, J.M., Garner, C.C., 2016. Shank3 is part of a zinc-sensitive signaling system that regulates excitatory synaptic strength. *J. Neurosci.* 36, 9124–9134. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-16.2016>
- Arons, M.H., Thynne, C.J., Grabrucker, A.M., Li, D., Schoen, M., Cheyne, J.E., Boeckers, T.M., Montgomery, J.M., Garner, C.C., 2012. Autism-associated mutations in ProSAP2/Shank3 impair synaptic transmission and neuroligin-mediated transsynaptic signaling. *J. Neurosci.* 32, 14966–14978. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2215-12.2012>
- Ash, R.T., Buffington, S.A., Park, J., Suter, B., Costa-Mattioli, M., Zoghbi, H.Y., Smirnakis, S.M., 2021. Inhibition of elevated ras-mapk signaling normalizes enhanced motor learning and excessive clustered dendritic spine stabilization in the mecp2-duplication syndrome mouse model of autism. *eNeuro* 8. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0056-21.2021>
- Assaf, S.Y., Chung, S.-H., 1984. Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity. *Nature* 308, 734–736.
- Awadalla, P., Gauthier, J., Myers, R.A., Casals, F., Hamdan, F.F., Griffing, A.R., Côté, M., Henrion, E., Spiegelman, D., Tarabeux, J., Piton, A., Yang, Y., Boyko, A., Bustamante, C., Xiong, L., Rapoport, J.L., Addington, A.M., Delisi, J.L.E., Krebs, M.O., Joobor, R., Millet, B., Fombonne, É., Mottron, L., Zilvermit, M., Keebler, J., Daoud, H., Marineau, C., Roy-Gagnon, M.H., Dubé, M.P., Eyre-Walker, A., Drapeau, P., Stone, E.A., Lafrenire, R.G., Rouleau, G.A., 2010. Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.019>
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., Rosen, M.K., 2017. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- Baron, M., Boeckers, T.M., Vaida, B., Faham, S., Gingery, M., Sawaya, M., Salyer, D., Gundelfinger, E., Bowie, J., 2006. An Architectural Framework That May Lie at the Core of the Postsynaptic Density. *Sci.* 311, 531–536.

- Bayer, K.U., De Koninck, P., Leonard, A.S., Hell, J.W., Schulman, H., 2001. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411, 801–805. <https://doi.org/10.1038/35081080>
- Bayer, K.U., LeBel, É., McDonald, G.L., O’Leary, H., Schulman, H., De Koninck, P., 2006. Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J. Neurosci.* 26, 1164–1174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3116-05.2006>
- Bear, M.F., Malenka, R.C., 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 389–399. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0959-4388(94)90101-5)
- Berkel, S., Marshall, C.R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., Endris, V., Roberts, W., Szatmari, P., Pinto, D., Bonin, M., Riess, A., Engels, H., Sprengel, R., Scherer, S.W., Rappold, G.A., 2010. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat. Genet.* 42, 489–491. <https://doi.org/10.1038/ng.589>
- Berkel, S., Tang, W., Treviño, M., Vogt, M., Obenaus, H.A., Gass, P., Scherer, S.W., Sprengel, R., Schratz, G., Rappold, G.A., 2012. Inherited and de novo SHANK2 variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology. *Hum. Mol. Genet.* 21, 344–357. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr470>
- Besser, L., Chorin, E., Sekler, I., Silverman, W.F., Atkin, S., Russell, J.T., Hershinkel, M., 2009. Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *J. Neurosci.* 29, 2890–2901. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5093-08.2009>
- Boccuto, L., Lauri, M., Sarasua, S.M., Skinner, C.D., Buccella, D., Dwivedi, A., Orteschi, D., Collins, J.S., Zollino, M., Visconti, P., Dupont, B., Tiziano, D., Schroer, R.J., Neri, G., Stevenson, R.E., Gurrieri, F., Schwartz, C.E., 2012. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* 21, 310–316. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.175>
- Böckers, T.M., Mameza, M.G., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Weise, C., Buck, F., Richter, D., Gundelfinger, E.D., Kreienkamp, H.J., 2001. Synaptic scaffolding proteins in rat brain: Ankyrin repeats of the multidomain Shank protein family interact with the cytoskeletal protein  $\alpha$ -fodrin. *J. Biol. Chem.* 276, 40104–40112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102454200>
- Böckers, T.M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E.D., Kreutz, M.R., Richter, D., Kindler, S., Kreienkamp, H.J., 2004. Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: Identification of a dendritic targeting element in the 3’ untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.01.009>
- Boeckers, T.M., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., 2002. ProSAP/Shank proteins - A family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J. Neurochem.* 81, 903–910. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00931.x>
- Boeckers, T.M., Liedtke, T., Spilker, C., Dresbach, T., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., 2005. C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3. *J. Neurochem.* 92, 519–524. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02910.x>
- Boeckers, T.M., Winter, C., Smalla, K., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D., 1999. Proline-Rich Synapse-Associated Proteins ProSAP1 and ProSAP2 Interact with Synaptic Proteins of the SAPAP / GKAP Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 247–252.

- Bonaglia, M.C., Giorda, R., Beri, S., de Agostini, C., Novara, F., Fichera, M., Grillo, L., Galesi, O., Vetro, A., Ciccone, R., Bonati, M.T., Giglio, S., Guerrini, R., Osimani, S., Marelli, S., Zucca, C., Grasso, R., Borgatti, R., Mani, E., Motta, C., Molteni, M., Romano, C., Greco, D., Reitano, S., Baroncini, A., Lapi, E., Cecconi, A., Arrigo, G., Patricelli, M.G., Pantaleoni, C., D'Arrigo, S., Riva, D., Sciacca, F., Bernardina, D.B., Zoccante, L., Darra, F., Termine, C., Maserati, E., Bigoni, S., Priolo, E., Bottani, A., Gimelli, S., Bena, F., Brusco, A., Gregorio, E., Bagnasco, I., Giussani, U., Nitsch, L., Politi, P., Martinez-Frias, M.L., Martínez-Fernández, M.L., Guardia, N., Bremer, A., Anderlid, B.M., Zuffardi, O., 2011. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with phelan/mcdermid syndrome. *PLoS Genet.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002173>
- Bourgeron, T., 2009. A synaptic trek to autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.06.003>
- Bourne, J.N., Harris, K.M., 2011. Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced structural plasticity along mature hippocampal CA1 dendrites during LTP. *Hippocampus* 21, 354–373. <https://doi.org/10.1002/hipo.20768>
- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D.L., Takahashi, N., Kajiwara, Y., Yang, M., Katz, A.M., Scattoni, M., Harris, M.J., Saxena, R., Silverman, J.L., Crawley, J.N., Zhou, Q., Hof, P.R., Buxbaum, J.D., 2010. Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol. Autism* 1, 1–15. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-1-15>
- Broadhead, M.J., Horrocks, M.H., Zhu, F., Muresan, L., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., Fricker, D., Kopanitsa, M. V., Duncan, R.R., Klenerman, D., Komiyama, N.H., Lee, S.F., Grant, S.G.N., 2016. PSD95 nanoclusters are postsynaptic building blocks in hippocampus circuits. *Sci. Rep.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24626>
- Brocke, L., Chiang, L.W., Wagner, P.D., Schulman, H., 1999. Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II. *J. Biol. Chem.* 274, 22713–22722. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22713>
- Bruining, H., Hardstone, R., Juarez-Martinez, E.L., Sprengers, J., Avramiea, A.E., Simpraga, S., Houtman, S.J., Poil, S.S., Dallares, E., Palva, S., Oranje, B., Matias Palva, J., Mansvelter, H.D., Linkenkaer-Hansen, K., 2020. Measurement of excitation-inhibition ratio in autism spectrum disorder using critical brain dynamics. *Sci. Rep.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65500-4>
- Bucher, M., Niebling, S., Han, Y., Molodenskiy, D., Hassani Nia, F., Kreienkamp, H.J., Svergun, D., Kim, E., Kostyukova, A.S., Kreutz, M.R., Mikhaylova, M., 2021. Autism-associated shank3 missense point mutations impact conformational fluctuations and protein turnover at synapses. *Elife* 10, 1–42. <https://doi.org/10.7554/eLife.66165>
- Cai, Q., Hosokawa, T., Zeng, M., Hayashi, Y., Zhang, M., 2020a. Shank3 Binds to and Stabilizes the Active Form of Rap1 and HRas GTPases via Its NTD-ANK Tandem with Distinct Mechanisms. *Structure* 28, 290-300.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.11.018>
- Cai, Q., Zeng, M., Wu, H., Zhan, Y., Tian, R., Zhang, M., 2020b. CaMKII  $\alpha$ -driven, phosphatase-checked postsynaptic plasticity via phase separation. *Cell Res.* 0, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00439-9>
- Calvin, O.L., Redish, A.D., 2021. Global disruption in excitation-inhibition balance can cause localized network dysfunction and Schizophrenia-like context-integration deficits. *PLoS Comput. Biol.* 17, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008985>

- Chen, H.J., Rojas-Soto, M., Oguni, A., Kennedy, M.B., 1998. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20, 895–904. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80471-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80471-7)
- Chen, J., Yu, S., Fu, Y., Li, X., 2014. Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00276>
- Chen, X., Wu, X., Wu, H., Zhang, M., 2020. Phase separation at the synapse. *Nat. Neurosci.* 23, 301–310. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0579-9>
- Chilian, B., Abdollahpour, H., Bierhals, T., Haltrich, I., Fekete, G., Nagel, I., Rosenberger, G., Kutsche, K., 2013. Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. *Clin. Genet.* 84, 560–565. <https://doi.org/10.1111/cge.12105>
- Chklovskii, D.B., 2004. Synaptic connectivity and neuronal morphology: Two sides of the same coin. *Neuron* 43, 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.012>
- Clement, J., Aceti, M., Creson, T., Ozkan, E., Shi, Y., Reish, N., Almonte, A., 2012. Pathogenic SYNGAP1 mutations impair cognitive development by disrupting the maturation of dendritic spine synapses. *Cell* 154, 709–723.
- Coba, M.P., Pocklington, A.J., Collins, M.O., Kopanitsa, M. V., Uren, R.T., Swamy, S., Croning, M.D.R., Choudhary, J.S., Grant, S.G.N., 2009. Neurotransmitters drive combinatorial multistate postsynaptic density networks. *Sci. Signal.* 2, ra19. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000102>
- Cohen, R.S., Blomberg, F., Berzins, K., Siekevitz, P., 1977. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. *J. Cell Biol.* 74, 181–203.
- Coombs, B.Y.J.S., Eccles, J.C., Fatt, P., 1955. THE SPECIFIC IONIC CONDUCTANCES AND THE IONIC MOVEMENTS ACROSS THE MOTONEURONAL MEMBRANE THAT PRODUCE THE INHIBITORY POST-SYNAPTIC POTENTIAL. *J. Physiol.* 130, 326–373.
- Derkach, V., Barria, A., Soderling, T.R., 1999. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3269–3274. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3269>
- Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S., Soderling, T.R., 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrn2055>
- Diering, G.H., Hugarir, R.L., 2018. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron* 100, 314–329. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.018>
- Doddata, G., Fabbiani, A., Scandurra, V., Canitano, R., Mencarelli, M.A., Renieri, A., Ariani, F., 2022. Identification of a Novel SHANK2 Pathogenic Variant in a Patient with a Neurodevelopmental Disorder. *Genes (Basel)*. 13, 1–8.
- Du, Y., Weed, S.A., Xiong, W., Marshall, T.D., Parsons, J.T., 1998. Identification of a Novel Cortactin SH3 Domain-Binding Protein and Its Localization to Growth Cones of Cultured Neurons. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5838–5851.
- Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I.C., Anckarsäter, H., Sponheim, E., Goubran-Botros, H., Delorme, R., Chabane, N., Mouren-Simeoni, M.C., De Mas, P., Bieth, E., Rogé, B., Héron, D., Burglen, L., Gillberg, C., Leboyer, M., Bourgeron, T., 2007. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* 39, 25–27. <https://doi.org/10.1038/ng1933>

- Durand, C.M., 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. *Mol. Psychiatry* 17, 71–84. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.57>
- Eltokhi, A., Rappold, G., Sprengel, R., 2018. Distinct Phenotypes of Shank2 Mouse Models Reflect Neuropsychiatric Spectrum Disorders of Human Patients With SHANK2 Variants. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00240>
- Faridar, A., Jones-Davis, D., Rider, E., Li, J., Gobius, I., Morcom, L., Richards, L.J., Sen, S., Sherr, E.H., 2014. Mapk/Erk activation in an animal model of social deficits shows a possible link to autism. *Mol. Autism* 5. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-57>
- Feng, Z., Chen, X., Wu, X., Zhang, M., 2019. Formation of biological condensates via phase separation: Characteristics, analytical methods, and physiological implications. *J. Biol. Chem.* 294, 14823–14835. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007895>
- Franze, K., Guck, J., 2010. The biophysics of neuronal growth. *Reports Prog. Phys.* 73. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/73/9/094601>
- Frederickson, Christopher J., Giblin, L.J., Rengarajan, B., Masalha, R., Frederickson, Cathleen J., Zeng, Y., Lopez, E.V., Koh, J.Y., Chorin, U., Besser, L., Hershinkel, M., Li, Y., Thompson, R.B., Krezel, A., 2006. Synaptic release of zinc from brain slices: Factors governing release, imaging, and accurate calculation of concentration. *J. Neurosci. Methods* 154, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.11.014>
- Frye, R.E., 2018. Social Skills Deficits in Autism Spectrum Disorder: Potential Biological Origins and Progress in Developing Therapeutic Agents. *CNS Drugs* 32, 713–734. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0556-y>
- Garg, S., Brooks, A., Burns, A., Burkitt-Wright, E., Kerr, B., Huson, S., Emsley, R., Green, J., 2017. Autism spectrum disorder and other neurobehavioural comorbidities in rare disorders of the Ras/MAPK pathway. *Dev. Med. Child Neurol.* 59, 544–549. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13394>
- Gauthier, J., Champagne, N., Lafrenière, R.G., Xiong, L., Spiegelman, D., Brustein, E., Lapointe, M., Peng, H., Côté, M., Noreau, A., Hamdan, F.F., Addington, A.M., Rapoport, J.L., DeLisi, L.E., Krebs, M.O., Joobar, R., Fathalli, F., Mouaffak, F., Haghghi, A.P., Néri, C., Dubé, M.P., Samuels, M.E., Marineau, C., Stone, E.A., Awadalla, P., Barker, P.A., Carbonetto, S., Drapeau, P., Rouleau, G.A., Daignault, K., Diallo, O., Duguay, J., Drits, M., Henrion, E., Jolivet, P., Kuku, F., Lachapelle, K., Laliberté, G., Laurent, S., Liao, M., Marino, C., Piton, A., Raymond, A., Reynolds, A., Rochefort, D., St-Onge, J., Thibodeau, P., Tsurudome, K., Yang, Y., Leroy, S., Ossian, K., Chayet, M., Gourion, D., 2010. De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7863–7868. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906232107>
- Gauthier, J., Spiegelman, D., Lafreni, R.G., Laurent, S., Stonge, J., Lapointe, L., Hamdan, F.F., Cossette, P., Mottron, L., Fombonne, E., Joobar, R., Marineau, C., Drapeau, P., Rouleau, G.A., 2008. Novel De Novo SHANK3 Mutation in Autistic Patients. *Am. J. Med. Genet. Part B* 150, 421–424. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30822>
- Gower-Winter, S.D., Levenson, C.W., 2012. Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. *BioFactors* 38, 186–193. <https://doi.org/10.1002/biof.1012>
- Grabrucker, A., Schmeisser, M.J., Schoen, M., Boeckers, T.M., 2011. Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends Cell Biol.* 21, 594–603.

- Grabruker, A., Knight, M.J., Proepper, C., Bockmann, J., Joubert, M., Rowan, M., Nienhaus, G.U., Garner, C.C., Bowie, J.U., Kreutz, M.R., Eckart, D., Boeckers, T.M., 2011. Concerted action of zinc and ProSAP / Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *EMBO J.* 30, 569–581. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.336>
- Grabruker, S., Boeckers, T.M., Grabruker, A.M., 2016. Gender dependent evaluation of autism like behavior in mice exposed to prenatal zinc deficiency. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00037>
- Grabruker, S., Jannetti, L., Eckert, M., Gaub, S., Chhabra, R., Pfaender, S., Mangus, K., Reddy, P.P., Rankovic, V., Schmeisser, M.J., Kreutz, M.R., Ehret, G., Boeckers, T.M., Grabruker, A.M., 2014. Zinc deficiency dysregulates the synaptic ProSAP/Shank scaffold and might contribute to autism spectrum disorders. *Brain* 137, 137–152. <https://doi.org/10.1093/brain/awt303>
- Grant, S.G.N., 2012. Synaptopathies: Diseases of the synaptome. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.02.002>
- Han, C.W., Jeong, M.S., Jang, S.B., 2017. Structure, signaling and the drug discovery of the Ras oncogene protein. *BMB Rep.* 50, 355–360. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.7.062>
- Han, K., Holder, J.L., Schaaf, C.P., Lu, H., Chen, H., Kang, H., Tang, J., Wu, Z., Hao, S., Cheung, S.W., Yu, P., Sun, H., Breman, A.M., Patel, A., Lu, H.C., Zoghbi, H.Y., 2013. SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* 503, 72–77. <https://doi.org/10.1038/nature12630>
- Hancock, J.F., 2003. Ras proteins: Different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 373–384. <https://doi.org/10.1038/nrm1105>
- Harris, K.M., Weinberg, R., 2012. Mammalian Brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 1–30.
- Hassani Nia, F., 2019. Autism-associated mutations interfere with the function of the Shank3 N-terminus in postsynaptic signaling pathways. Dissertation, Universität Hamburg.
- Hassani Nia, F., Kreienkamp, H.J., 2018. Functional Relevance of Missense Mutations Affecting the N-Terminal Part of Shank3 Found in Autistic Patients. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00268>
- Hassani Nia, F., Woike, D., Kloth, K., Kortüm, F., Kreienkamp, H.J., 2020a. Truncating mutations in SHANK3 associated with global developmental delay interfere with nuclear  $\beta$ -catenin signaling. *J. Neurochem.* 155, 250–263. <https://doi.org/10.1111/jnc.15014>
- Hassani Nia, F., Woike, D., Martens, V., Klüssendorf, M., Hönck, H.H., Harder, S., Kreienkamp, H.J., 2020b. Targeting of  $\delta$ -catenin to postsynaptic sites through interaction with the Shank3 N-terminus. *Mol. Autism* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-00385-8>
- Hayashi, M.K., Tang, C., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M.H., Xu, R., Li, H., Sala, C., Hayashi, Y., 2010. The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell* 137, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.050>
- Hell, J.W., 2014. CaMKII: Claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron* 81, 249–265. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.024>
- Ho, C., Zhou, J., Medina, M., Goto, T., Jacobson, M., Bhide, P.G., Kosik, K.S., 2000.  $\delta$ -Catenin is a nervous system-specific adherens junction protein which undergoes dynamic relocalization during development. *J. Comp. Neurol.* 420, 261–276. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000501\)420:2<261::AID-CNE8>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000501)420:2<261::AID-CNE8>3.0.CO;2-Q)

- Homann, O.R., Misura, K., Lamas, E., Sandrock, R.W., Nelson, P., Mcdonough, S.I., De Lisi, L.E., 2016. Whole-genome sequencing in multiplex families with psychoses reveals mutations in the SHANK2 and SMARCA1 genes segregating with illness. *Mol. Psychiatry* 21, 1690–1695. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.24>
- Hruska, M., Henderson, N., Le Marchand, S.J., Jafri, H., Dalva, M.B., 2018. Synaptic nanomodules underlie the organization and plasticity of spine synapses. *Nat. Neurosci.* 21, 671–682. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0138-9>
- Huguet, G., Ey, E., Bourgeron, T., 2013. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14, 191–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153431>
- Hyman, A.A., Weber, C.A., Jülicher, F., 2014. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 39–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>
- Hyman, S., 2005. Neurotransmitters. *Curr. Biol.* 15, R154-8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.55040-5>
- Ito, S., 2016. GABA and glycine in the developing brain. *J. Physiol. Sci.* 66, 375–379. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0442-7>
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, Carina, Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, Christopher, Bourgeron, T., Nydén, A., Philippe, A., Cohen, D., Chabane, N., Mouren-Siméoni, M.C., Brice, A., Sponheim, E., Spurkland, I., Skjeldal, O.H., Coleman, M., Pearl, P.L., Cohen, I.L., Tsiouris, J., Zappella, M., Menchetti, G., Pompella, A., Aschauer, H., Van Maldergem, L., 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29. <https://doi.org/10.1038/ng1136>
- Jan, H.H., Chen, I.T., Tsai, Y.Y., Chang, Y.C., 2002. Structural role of zinc ions bound to postsynaptic densities. *J. Neurochem.* 83, 525–534. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01093.x>
- Jeong, J., Li, Y., Roche, K.W., 2021. CaMKII phosphorylation regulates synaptic enrichment of Shank3. *eNeuro* 8. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0481-20.2021>
- Jiang, Y., Ehlers, M.D., 2013. Modeling Autism by SHANK Gene Mutations in Mice. *Neuron* 78, 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.016>
- Kanani, F., Study, D., Balasubramanian, M., 2018. SHANK3 variant as a cause of nonsyndromal autism in an 11-year-old boy and a review of published literature. *Clin. Dysmorphol.* 27, 113–115. <https://doi.org/10.1097/MCD.0000000000000232>
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H., 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360–368. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00162-0)
- Kennedy, M.B., 2000. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* (80- ). 290, 750–754. <https://doi.org/10.1126/science.290.5492.750>
- Kida, S., Serita, T., 2014. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Res. Bull.* 105, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.04.011>
- Kim, H., Han, J.R., Park, J., Oh, M., James, S.E., Chang, S., Lu, Q., Kwang, Y.L., Ki, H., Song, W.J., Kim, K., 2008.  $\delta$ -Catenin-induced dendritic morphogenesis: An essential role of p190RhoGEF interaction through AKT1-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283, 977–987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707158200>

- Kim, H.G., Kishikawa, S., Higgins, A.W., Seong, I.S., Donovan, D.J., Shen, Y., Lally, E., Weiss, L.A., Najm, J., Kutsche, K., Descartes, M., Holt, L., Braddock, S., Troxell, R., Kaplan, L., Volkmar, F., Klin, A., Tsatsanis, K., Harris, D.J., Noens, I., Pauls, D.L., Daly, M.J., MacDonald, M.E.E., Morton, C.C., Quade, B.J., Gusella, J.F., 2008. Disruption of Neurexin 1 Associated with Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.011>
- Kim, H.H., Lee, K.H., Lee, D., Han, Y.E., Lee, S.H., Sohn, J.W., Ho, W.K., 2015. Costimulation of AMPA and metabotropic glutamate receptors underlies phospholipase C activation by glutamate in hippocampus. *J. Neurosci.* 35, 6401–6412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4208-14.2015>
- Kreienkamp, H.J., 2008. Scaffolding Proteins at the Postsynaptic Density: Shank as the Architectural Framework. *Handb. Exp. Pharmacol.* 186, 365–380. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-72843-6-15>
- Landa, R.J., 2008. Diagnosis of autism spectrum disorders in the first 3 years of life. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4, 138–147. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0731>
- Leblond, C.S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., Huguet, G., Konyukh, M., Chaste, P., Ey, E., Rastam, M., Anckarsäter, H., Nygren, G., Gillberg, I.C., Melke, J., Toro, R., Regnault, B., Fauchereau, F., Mercati, O., Lemièrè, N., Skuse, D., Poot, M., Holt, R., Monaco, A.P., Järvelä, I., Kantojärvi, K., Vanhala, R., Curran, S., Collier, D.A., Bolton, P., Chiocchetti, A., Klauck, S.M., Poustka, F., Freitag, C.M., Waltes, R., Kopp, M., Duketis, E., Bacchelli, E., Minopoli, F., Ruta, L., Battaglia, A., Mazzone, L., Maestrini, E., Sequeira, A.F., Oliveira, B., Vicente, A., Oliveira, G., Pinto, D., Scherer, S.W., Zelenika, D., Delepine, M., Lathrop, M., Bonneau, D., Guinchat, V., Devillard, F., Assouline, B., Mouren, M.C., Leboyer, M., Gillberg, C., Boeckers, T.M., Bourgeron, T., 2012. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genet.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002521>
- Leblond, C.S., Nava, C., Polge, A., Gauthier, J., Huguet, G., Lumbroso, S., Giuliano, F., Stordeur, C., Depienne, C., Mouzat, K., Pinto, D., Howe, J., Lemièrè, N., Durand, C.M., Guibert, J., Ey, E., Toro, R., Peyre, H., Mathieu, A., Amsellem, F., Rastam, M., Gillberg, I.C., Rappold, G. a., Holt, R., Monaco, A.P., Maestrini, E., Galan, P., Heron, D., Jacquette, A., Afejar, 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., Ederly, P., Perrin, L., Tabet, A.C., Schmeisser, M.J., Boeckers, T.M., Coleman, M., Sato, D., Szatmari, P., Scherer, S.W., Rouleau, G. a., Betancur, C., Leboyer, M., Gillberg, C., Delorme, R., Bourgeron, T., 2014. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments. *PLoS Genet.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004580>
- 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. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00094>
- Lepeta, K., Lourenco, M. V., Schweitzer, B.C., Martino Adami, P. V., Banerjee, P., Catuara-Solarz, S., de La Fuente Revenga, M., Guillem, A.M., Haidar, M., Ijomone, O.M., Nadorp, B., Qi, L., Perera, N.D., Refsgaard, L.K., Reid, K.M., Sabbar, M., Sahoo, A., Schaefer, N., Sheean, R.K., Suska, A., Verma, R., Vicidomini, C., Wright, D., Zhang, X.D., Seidenbecher, C., 2016. Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders – A review from students to students. *J. Neurochem.* 138, 785–805. <https://doi.org/10.1111/jnc.13713>
- Li, Y., Hough, C.J., Frederickson, C.J., Sarvey, J.M., 2001. Induction of mossy fiber→CA3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn<sup>2+</sup>. *J. Neurosci.* 21, 8015–8025. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-20-08015.2001>

- Lilja, J., Zacharchenko, T., Georgiadou, M., Jacquemet, G., De Franceschi, N., Peuhu, E., Hamidi, H., Pouwels, J., Martens, V., Nia, F.H., Beifuss, M., Boeckers, T., Kreienkamp, H.J., Barsukov, I.L., Ivaska, J., 2017. SHANK proteins limit integrin activation by directly interacting with Rap1 and R-Ras. *Nat. Cell Biol.* 19, 292–305. <https://doi.org/10.1038/ncb3487>
- Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J.I., Suh, P.G., Sheng, M., Eunjoon, K., 1999. Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J. Biol. Chem.* 274, 29510–29518. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29510>
- 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. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 385–397. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0940>
- Lin, Y.C., Frei, J.A., Kilander, M.B.C., Shen, W., Blatt, G.J., 2016. A subset of autism-associated genes regulate the structural stability of neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 1–35. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00263>
- Lisman, J., Yasuda, R., Raghavachari, S., 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Lisman, J.E., Raghavachari, S., Tsien, R.W., 2007. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 597–609. <https://doi.org/10.1038/nrn2191>
- Lu, Q., Paredes, M., Medina, M., Zhou, J., Cavallo, R., Peifer, M., Orecchio, L., Kosik, K.S., 1999.  $\delta$ -Catenin, an Adhesive Junction-associated Protein Which Promotes Cell Scattering. *J. Cell Biol.* 144, 519–532. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.3.519>
- Ma, S.L., Chen, L.H., Lee, C.C., Lai, K.Y.C., Hung, S.F., Tang, C.P., Ho, T.P., Shea, C., Mo, F., Mak, T.S.H., Sham, P.C., Leung, P.W.L., 2021. Genetic Overlap Between Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder in SHANK2 Gene. *Front. Neurosci.* 15, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.649588>
- MacGillavry, H.D., Song, Y., Raghavachari, S., Blanpied, T.A., 2013. Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic ampa receptors. *Neuron* 78, 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.009>
- Magee, J.C., Grienberger, C., 2020. Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 43, 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-090919-022842>
- Mameza, M.G., Dvoretzkova, E., Bamann, M., Hönck, H., Güler, T., Boeckers, T.M., Schoen, M., Verpelli, C., Sala, C., Barsukov, I., Dityatev, A., 2013. SHANK3 Gene Mutations Associated with Autism Facilitate Ligand Binding to the Shank3 Ankyrin Repeat Region. *J. Biol. Chem.* 288, 26697–26708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424747>
- McAllister, B.B., Dyck, R.H., 2017. Zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc in central nervous system function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80, 329–350. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.06.006>
- Medina, M., Marinescu, R.C., Overhauser, J., Kosik, K.S., 2000. Hemizyosity of  $\delta$ -catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics* 63, 157–164. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.6090>
- Meyer, G., Varoqueaux, F., Neeb, A., Oschlies, M., Brose, N., 2004. The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: A case study on neuroligin. *Neuropharmacology* 47, 724–733. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.023>

- Miller, S.G., Kennedy, M.B., 1986. Regulation of Brain Type II Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin- Dependent Protein Kinase by Autophosphorylation: A Ca<sup>2+</sup>-Triggered Molecular Switch. *Cell* 44, 861–870.
- Moessner, R., Marshall, C.R., Sutcliffe, J.S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B., Roberts, W., Szatmari, P., Scherer, S.W., 2007. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 1289–1297. <https://doi.org/10.1086/522590>
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A.P., Kim, H.J., Mittag, T., Taylor, J.P., 2015. Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell* 163, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.015>
- Monteiro, P., Feng, G., 2017. SHANK proteins: Roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 147–157. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
- Nair, D., Hosy, E., Petersen, J.D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., Sibarita, J.B., 2013. Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J. Neurosci.* 33, 13204–13224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013>
- Naisbitt, S., Eunjoon, K., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F., Sheng, M., 1999. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23, 569–582. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80809-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80809-0)
- Nelson, S.B., Valakh, V., 2015. Excitatory/Inhibitory balance and circuit homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 87, 684–698.
- Newschaffer, C.J., Croen, L.A., Daniels, J., Giarelli, E., Grether, J.K., Levy, S.E., Mandell, D.S., Miller, L.A., Pinto-Martin, J., Reaven, J., Reynolds, A.M., Rice, C.E., Schendel, D., Windham, G.C., 2007. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Public Health* 28, 235–258. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144007>
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K., 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>
- Oh, W.C., Hill, T.C., Zito, K., 2013. Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214705110>
- Okabe, S., 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 503–518. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.01.006>
- Pacitti, D., Privolizzi, R., Bax, B.E., 2019. Organs to cells and cells to organoids: The evolution of In vitro central nervous system modelling. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00129>
- Palay, B.Y.S.L., 1956. Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol* 2, 239–256.
- Park, M., 2018. AMPA receptor trafficking for postsynaptic potentiation. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00361>
- Patterson, M.A., Szatmari, E.M., Yasuda, R., 2010. AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15951–15956. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913875107>
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J.T., Wang, W., Wells, M.F., Venkatraman, T.N., Lascola, C.D., Fu, Z., Feng, G., 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472, 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>

- Peper, C., van der Wal, S.J., Begeer, S., 2016. Autism in action: Reduced bodily connectedness during social interactions? *Front. Psychol.* 7, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.01862>
- Pérez-Clausell, J., Danscher, G., 1985. Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res.* 337, 91–98. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91612-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91612-9)
- Perfitt, T.L., Stauffer, P.E., Spiess, K.L., Colbran, R.J., 2020a. CaMKII $\alpha$  phosphorylation of Shank3 modulates ABI1-Shank3 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 524, 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.089>
- Perfitt, T.L., Wang, X., Dickerson, M.T., Stephenson, J.R., Nakagawa, T., Jacobson, D.A., Colbran, R.J., 2020b. Neuronal L-type calcium channel signaling to the nucleus requires a novel CaMKII $\alpha$ -SHANK3 interaction. *J. Neurosci.* 40, 2000–2014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-19.2020>
- Peykov, S., Berkel, S., Schoen, M., Weiss, K., Degenhardt, F., Strohmaier, J., Weiss, B., Proepper, C., Schrott, G., Nöthen, M.M., Boeckers, T.M., Rietschel, M., Rappold, G.A., 2015. Identification and functional characterization of rare SHANK2 variants in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 20, 1489–1498. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.172>
- Pinto, D., Pagnamenta, A.T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C., Abrahams, B.S., Almeida, J., Bacchelli, E., Bader, G.D., Bailey, A.J., Baird, G., Battaglia, A., Berney, T., Bolshakova, N., Bölte, S., Bolton, P.F., Bourgeron, T., Brennan, S., Brian, J., Bryson, S.E., Carson, A.R., Casallo, G., Casey, J., Chung, B.H.Y., Cochrane, L., Corsello, C., Crawford, E.L., Crossett, A., Cytrynbaum, C., Dawson, G., De Jonge, M., Delorme, R., Drmic, I., Duketis, E., Duque, F., Estes, A., Farrar, P., Fernandez, B.A., Folstein, S.E., Fombonne, E., Freitag, C.M., Gilbert, J., Gillberg, C., Glessner, J.T., Goldberg, J., Green, A., Green, J., Guter, S.J., Hakonarson, H., Heron, E.A., Hill, M., Holt, R., Howe, J.L., Hughes, G., Hus, V., Iglizzi, R., Kim, C., Klauck, S.M., Klevzon, A., Korvatska, O., Kustanovich, V., Lajonchere, C.M., Lamb, J.A., Laskawiec, M., Leboyer, M., Le Couteur, A., Leventhal, B.L., Lionel, A.C., Liu, X.Q., Lord, C., Lotspeich, L., Lund, S.C., Maestrini, E., Mahoney, W., Mantoulan, C., Marshall, C.R., McConachie, H., McDougale, C.J., McGrath, J., McMahon, W.M., Merikangas, A., Migita, O., Minshew, N.J., Mirza, G.K., Munson, J., Nelson, S.F., Noakes, C., Noor, A., Nygren, G., Oliveira, G., Papanikolaou, K., Parr, J.R., Parrini, B., Paton, T., Pickles, A., Pilorge, M., Piven, J., Ponting, C.P., Posey, D.J., Poustka, A., Poustka, F., Prasad, A., Ragoussis, J., Renshaw, K., Rickaby, J., Roberts, W., Roeder, K., Roge, B., Rutter, M.L., Bierut, L.J., Rice, J.P., Salt, J., Sansom, K., Sato, D., Segurado, R., Sequeira, A.F., Senman, L., Shah, N., Sheffield, V.C., Soorya, L., Sousa, I., Stein, O., Sykes, N., Stoppioni, V., Strawbridge, C., Tancredi, R., Tansey, K., Thiruvahindrapuram, B., Thompson, A.P., Thomson, S., Tryfon, A., Tsiantis, J., Van Engeland, H., Vincent, J.B., Volkmar, F., Wallace, S., Wang, K., Wang, Z., Wassink, T.H., Webber, C., Weksberg, R., Wing, K., Wittemeyer, K., Wood, S., Wu, J., Yaspan, B.L., Zurawiecki, D., Zwaigenbaum, L., Buxbaum, J.D., Cantor, R.M., Cook, E.H., Coon, H., Cuccaro, M.L., Devlin, B., Ennis, S., Gallagher, L., Geschwind, D.H., Gill, M., Haines, J.L., Hallmayer, J., Miller, J., Monaco, A.P., Nurnberger, J.I., Paterson, A.D., Pericak-Vance, M.A., Schellenberg, G.D., Szatmari, P., Vicente, A.M., Vieland, V.J., Wijsman, E.M., Scherer, S.W., Sutcliffe, J.S., Betancur, C., 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466, 368–372. <https://doi.org/10.1038/nature09146>
- Proepper, C., Johannsen, S., Liebau, S., Dahl, J., Vaida, B., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., Boeckers, T.M., 2007. Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *EMBO J.* 26, 1397–1409. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601569>

- Pucilowska, J., Vithayathil, J., Pagani, M., Kelly, C., Karlo, J.C., Robol, C., Morella, I., Gozzi, A., Brambilla, R., Landreth, G.E., 2018. Pharmacological inhibition of ERK signaling rescues pathophysiology and behavioral phenotype associated with 16p11.2 chromosomal deletion in mice. *J. Neurosci.* 38, 6640–6652. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0515-17.2018>
- Qin, Y., Du, Y., Chen, L., Liu, Y., Yanyan, Xu, W., Liu, Ying, Li, Y., Leng, J., Wang, Y., Zhang, X.-Y., Feng, J., Zhang, F., Jin, L., Qiu, Z., Gong, X., Wang, H., 2022. A recurrent SHANK1 mutation implicated in autism spectrum disorder causes autistic-like core behaviors in mice via downregulation of mGluR1-IP3R1-calcium signaling. *Mol. Psychiatry* 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01539-1>
- Qin, Y., Zhu, Y., Baumgart, J.P., Stornetta, R.L., Seidenman, K., Mack, V., Van Aelst, L., Zhu, J.J., 2005. State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes Dev.* 19, 2000–2015. <https://doi.org/10.1101/gad.342205>
- Ramirez, A., Arbuckle, M.R., 2016. Synaptic Plasticity: The Role of Learning and Unlearning in Addiction and Beyond. *Biol. Psychiatry* 80, e73–e75. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.09.002>
- Ramiro-Cortés, Y., Hobbiss, A.F., Israely, I., 2014. Synaptic competition in structural plasticity and cognitive function. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 1–7. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0157>
- Ramsey, A.M., Tang, A.H., LeGates, T.A., Gou, X.Z., Carbone, B.E., Thompson, S.M., Biederer, T., Blanpied, T.A., 2021. Subsynaptic positioning of AMPARs by LRRTM2 controls synaptic strength. *Sci. Adv.* 7, 1–20. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf3126>
- Reim, D., Weis, T.M., Halbedl, S., Delling, J.P., Grabrucker, A.M., Boeckers, T.M., Schmeisser, M.J., 2016. The Shank3 interaction partner ProSAP1P1 regulates postsynaptic SPAR levels and the maturation of dendritic spines in hippocampal neurons. *Front. Synaptic Neurosci.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00013>
- 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. *J. Neurosci.* 24, 9391–9404. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3314-04.2004>
- Rubenstein, J.L.R., Merzenich, M.M., 2003. Model of autism: Increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain Behav.* 2, 255–267. <https://doi.org/10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x>
- Sala, C., Ch, V.P., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G., Sheng, M., 2001. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by scaffolding proteins. *Neuron* 31, 261–276. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-32562-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-0-387-32562-0_19)
- Salomaa, S.I., Miihkinen, M., Kremneva, E., Paatero, I., Lilja, J., Jacquemet, G., Vuorio, J., Antenucci, L., Hassani-Nia, F., Hollos, P., Isomursu, A., Vattulainen, I., Coffey, E.T., Kreienkamp, H.-J.J., Lappalainen, P., Ivaska, J., 2021. Conformational dynamics regulate SHANK3 actin and Rap1 binding. *Curr. Biol.* 31, P4956–4970.E9.
- Sato, D., Lionel, A.C., Leblond, C.S., Prasad, A., Pinto, D., Walker, S., O'Connor, I., Russell, C., Drmic, I.E., Hamdan, F.F., Michaud, J.L., Endris, V., Roeth, R., Delorme, R., Huguet, G., Leboyer, M., Rastam, M., Gillberg, C., Lathrop, M., Stavropoulos, D.J., Anagnostou, E., Weksberg, R., Fombonne, E., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B.A., Roberts, W., Rappold, G.A., Marshall, C.R., Bourgeron, T., Szatmari, P., Scherer, S.W., 2012. SHANK1 deletions in males with autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 879–887. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.017>

- Schmeisser, M.J., Ey, E., Wegener, S., Bockmann, J., Stempel, A.V., Kuebler, A., Janssen, A.L., Udvardi, P.T., Shiban, E., Spilker, C., Balschun, D., Skryabin, B. V., Dieck, S.T., Smalla, K.H., Montag, D., Leblond, C.S., Faure, P., Torquet, N., Le Sourd, A.M., Toro, R., Grabrucker, A.M., Shoichet, S.A., Schmitz, D., Kreutz, M.R., Bourgeron, T., Gundelfinger, E.D., Boeckers, T.M., 2012. Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature* 486, 256–260. <https://doi.org/10.1038/nature11015>
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F.L., 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* 16, 869–871. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0995fje>
- Sheng, M., Hoogenraad, C.C., 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
- Sheng, M., Kim, E., 2011. The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
- Sheng, M., Kim, E., 2000. The Shank family of scaffold proteins. *J. Cell Sci.* 1856, 1851–1856.
- Shin, S.M., Zhang, N., Hansen, J., Gerges, N.Z., Pak, D.T.S., Sheng, M., Lee, S.H., 2012. GKAP orchestrates activity-dependent postsynaptic protein remodeling and homeostatic scaling. *Nat. Neurosci.* 15, 1655–1666. <https://doi.org/10.1038/nn.3259>
- Shinoda, Y., Tanaka, T., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A., 2010. Persistent synapse loss induced by repetitive LTD in developing rat hippocampal neurons. *PLoS One* 5, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010390>
- Sohal, V.S., Rubenstein, J.L.R., 2019. Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 24, 1248–1257. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0426-0>
- Soltau, M., Richter, D., Kreienkamp, H.J., 2002. The Insulin Receptor Substrate IRSp53 Links Postsynaptic shank1 to the Small G-Protein cdc42. *Mol. Cell. Neurosci.* 583, 575–583. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1201>
- Stornetta, R.L., Zhu, J.J., 2011. Ras and Rap signaling in synaptic plasticity and mental disorders. *Neuroscientist* 17, 54–78. <https://doi.org/10.1177/1073858410365562>
- Strack, S., Colbran, R.J., 1998. Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 20689–20692. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.20689>
- Südhof, T.C., 2008. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, 903–911. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Tao-Cheng, J.H., Toy, D., Winters, C.A., Reese, T.S., Dosemeci, A., 2016. Zinc stabilizes SHANK3 at the postsynaptic density of hippocampal synapses. *PLoS One* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153979>
- Tatavarty, V., Torrado Pacheco, A., Groves Kuhnle, C., Lin, H., Koundinya, P., Miska, N.J., Hengen, K.B., Wagner, F.F., Van Hooser, S.D., Turrigiano, G.G., 2020. Autism-Associated Shank3 Is Essential for Homeostatic Compensation in Rodent V1. *Neuron* 106, 769–777.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.033>
- Tierney, A., Nelson, C., 2009. Brain Development and the Role of Experience in the Early Years. *Zero Three* 30, 9–13.

- Tomita, S., Stein, V., Stocker, T.J., Nicoll, R.A., Brecht, D.S., 2005. Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. *Neuron* 45, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.009>
- Trakoshis, S., Martínez-Cañada, P., Rocchi, F., Canella, C., You, W., Chakrabarti, B., Ruigrok, A.N.V., Bullmore, E.T., Suckling, J., Markicevic, M., Zerbi, V., Baron-Cohen, S., Gozzi, A., Lai, M.C., Panzeri, S., Lombardo, M. V., 2020. Intrinsic excitation-inhibition imbalance affects medial prefrontal cortex differently in autistic men versus women. *Elife* 9, 1–31. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55684>
- Tsai, C.H., Chen, K.L., Li, H.J., Chen, K.H., Hsu, C.W., Lu, C.H., Hsieh, K.Y., Huang, C.Y., 2020. The symptoms of autism including social communication deficits and repetitive and restricted behaviors are associated with different emotional and behavioral problems. *Sci. Rep.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76292-y>
- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., Worley, P.F., 1999. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23, 583–592. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80810-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80810-7)
- Turner, T.N., Sharma, K., Oh, E.C., Liu, Y.P., Collins, R.L., Sosa, M.X., Auer, D.R., Brand, H., Sanders, S.J., Moreno-De-Luca, D., Pihur, V., Plona, T., Pike, K., Soppet, D.R., Smith, M.W., Cheung, S.W., Martin, C.L., State, M.W., Talkowski, M.E., Cook, E., Haganir, R., Katsanis, N., Chakravarti, A., 2015. Loss of  $\delta$ -catenin function in severe autism. *Nature* 520, 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature14186>
- Van Spronsen, M., Hoogenraad, C.C., 2010. Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 10, 207–214. <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0104-8>
- Waga, C., Okamoto, N., Ondo, Y., Fukumura-Kato, R., Goto, Y.I., Kohsaka, S., Uchino, S., 2011. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr. Genet.* 21, 208–211. <https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e328341e069>
- Wan, L., Ai, J.Q., Yang, C., Jiang, J., Zhang, Q.L., Luo, Z.H., Huang, R.J., Tu, T., Pan, A., Tu, E., Manavis, J., Xiao, B., Yan, X.X., 2021. Expression of the Excitatory Postsynaptic Scaffolding Protein, Shank3, in Human Brain: Effect of Age and Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 13, 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.717263>
- Wang, L., Adamski, C.J., Bondar, V. V., Craigen, E., Collette, J.R., Pang, K., Han, K., Jain, A., Y. Jung, S., Liu, Z., Sifers, R.N., Holder, J.L., Zoghbi, H.Y., 2020a. A kinome-wide RNAi screen identifies ERK2 as a druggable regulator of Shank3 stability. *Mol. Psychiatry* 25, 2504–2516. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0325-9>
- Wang, L., Pang, K., Han, K., Adamski, C.J., Wang, W., He, L., Lai, J.K., Bondar, V. V., Duman, J.G., Richman, R., Tolia, K.F., Barth, P., Palzkill, T., Liu, Z., Holder, J.L., Zoghbi, H.Y., 2020b. An autism-linked missense mutation in SHANK3 reveals the modularity of Shank3 function. *Mol. Psychiatry* 25, 2534–2555. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0324-x>
- Wang, X., Bey, A.L., Katz, B.M., Badea, A., Kim, N., David, L.K., Duffney, L.J., Kumar, S., Mague, S.D., Hulbert, S.W., Dutta, N., Hayrapetyan, V., Yu, C., Gaidis, E., Zhao, S., Ding, J.D., Xu, Q., Chung, L., Rodriguiz, R.M., Wang, F., Weinberg, R.J., Wetsel, W.C., Dzirasa, K., Yin, H., Jiang, Y.H., 2016. Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nat. Commun.* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11459>

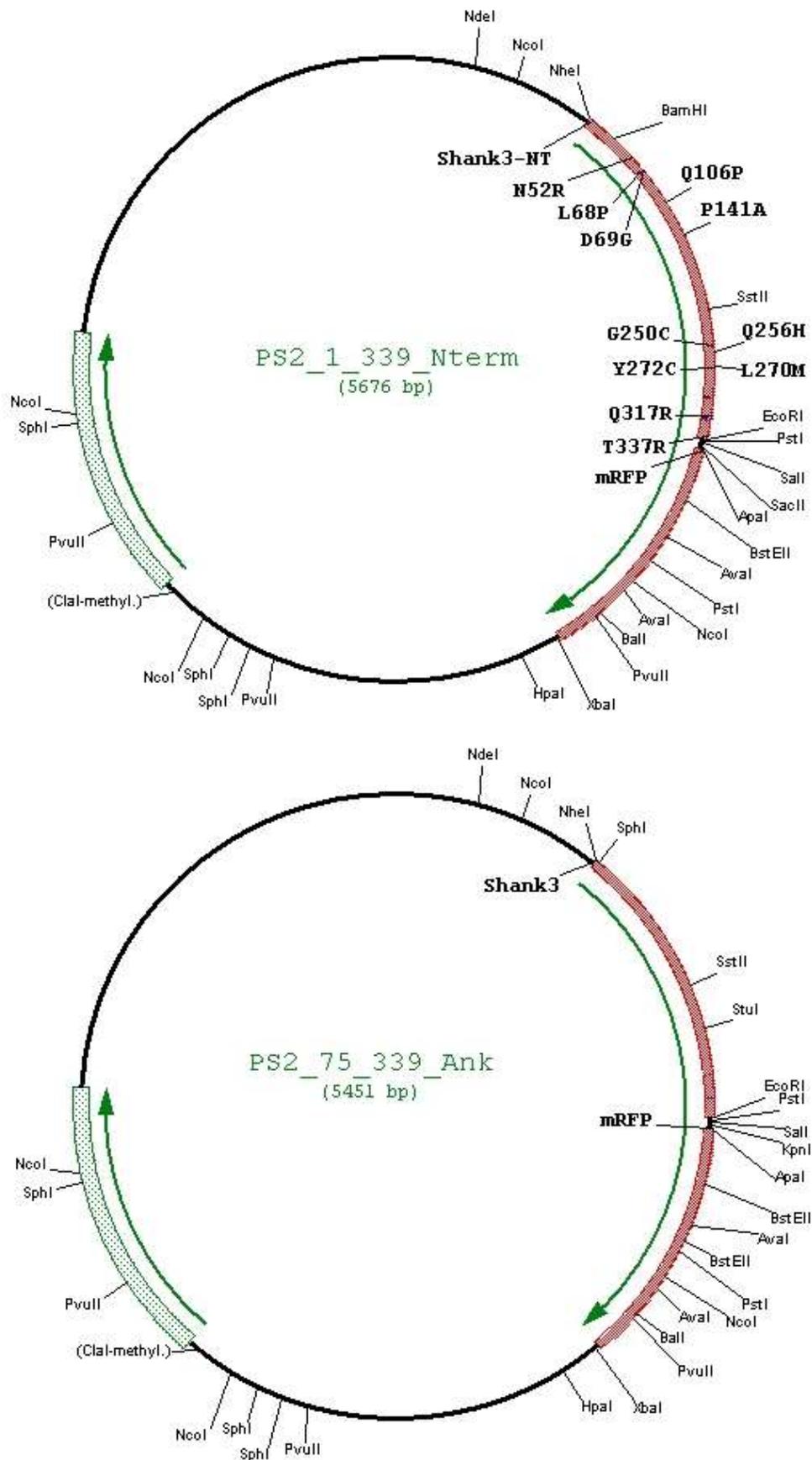
- Wang, X., Xu, Q., Bey, A.L., Lee, Y., Jiang, Y.H., 2014. Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice. *Mol. Autism* 5, 1–14. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-30>
- Willemsen-Swinkels, S.H.N., Buitelaar, J.K., 2002. The autistic spectrum: Subgroups, boundaries, and treatment. *Psychiatr. Clin. North Am.* 25, 811–836. [https://doi.org/10.1016/S0193-953X\(02\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0193-953X(02)00020-5)
- Williams, R.R.M.C., Gidey, E., Fouassier, L., Weed, S.A., Doctor, R.B., 2004. Characterization of an ankyrin repeat-containing Shank2 isoform (Shank2E) in liver epithelial cells. *Biochem. J.* 380, 181–191.
- Wischmeijer, A., Magini, P., Giorda, R., Gnoli, M., Ciccone, R., Cecconi, I., Franzoni, E., Mazzanti, L., Romeo, G., Zuffardi, O., Seri, M., 2011. Olfactory receptor-related duplicons mediate a microdeletion at 11q13.2q13.4 associated with a syndromic phenotype. *Mol. Syndromol.* 1, 176–184. <https://doi.org/10.1159/000322054>
- Woike, D., Wang, E., Tibbe, D., Hassani Nia, F., Failla, A.V., Kibæk, M., Overgård, T.M., Larsen, M.J., Fagerberg, C.R., Barsukov, I., Kreienkamp, H.J., 2022. Mutations affecting the N-terminal domains of SHANK3 point to different pathomechanisms in neurodevelopmental disorders. *Sci. Rep.* 12, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04723-5>
- Won, H., Lee, H.R., Gee, H.Y., Mah, W., Kim, J.I., Lee, J., Ha, S., Chung, C., Jung, E.S., Cho, Y.S., Park, S.G., Lee, J.S., Lee, K., Kim, D., Bae, Y.C., Kaang, B.K., Lee, M.G., Kim, E., 2012. Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature* 486, 261–265. <https://doi.org/10.1038/nature11208>
- Yang, K., Cao, F., Sheikh, A.M., Malik, M., Wen, G., Wei, H., Ted Brown, W., Li, X., 2013. Up-regulation of Ras/Raf/ERK1/2 signaling impairs cultured neuronal cell migration, neurogenesis, synapse formation, and dendritic spine development. *Brain Struct. Funct.* 218, 669–682. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0420-7>
- Yuen, R.K.C., Merico, D., Bookman, M., Howe, J.L., Thiruvahindrapuram, B., Patel, R. V., Whitney, J., Deflaux, N., Bingham, J., Wang, Z., Pellecchia, G., Buchanan, J.A., Walker, S., Marshall, C.R., Uddin, M., Zarrei, M., Deneault, E., D’Abate, L., Chan, A.J.S., Koyanagi, S., Paton, T., Pereira, S.L., Hoang, N., Engchuan, W., Higginbotham, E.J., Ho, K., Lamoureux, S., Li, W., MacDonald, J.R., Nalpathamkalam, T., Sung, W.W.L., Tsoi, F.J., Wei, J., Xu, L., Tasse, A.M., Kirby, E., Van Etten, W., Twigger, S., Roberts, W., Drmic, I., Jilderda, S., Modi, B.M., Kellam, B., Szego, M., Cytrynbaum, C., Weksberg, R., Zwaigenbaum, L., Woodbury-Smith, M., Brian, J., Senman, L., Iaboni, A., Doyle-Thomas, K., Thompson, A., Chrysler, C., Leef, J., Savion-Lemieux, T., Smith, I.M., Liu, X., Nicolson, R., Seifer, V., Fedele, A., Cook, E.H., Dager, S., Estes, A., Gallagher, L., Malow, B.A., Parr, J.R., Spence, S.J., Vorstman, J., Frey, B.J., Robinson, J.T., Strug, L.J., Fernandez, B.A., Elsabbagh, M., Carter, M.T., Hallmayer, J., Knoppers, B.M., Anagnostou, E., Szatmari, P., Ring, R.H., Glazer, D., Pletcher, M.T., Scherer, S.W., 2017. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* 20, 602–611. <https://doi.org/10.1038/nn.4524>
- Zeng, M., Chen, X., Guan, D., Xu, J., Wu, H., Tong, P., Zhang, M., 2018. Reconstituted Postsynaptic Density as a Molecular Platform for Understanding Synapse Formation and Plasticity. *Cell* 174, 1172–1187.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.047>
- Zhong, J., 2016. RAS and downstream RAF-MEK and PI3K-AKT signaling in neuronal development, function and dysfunction. *Biol. Chem.* 397, 215–222. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0270>

Zhou, Q., Homma, K.J., Poo, M.M., 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>

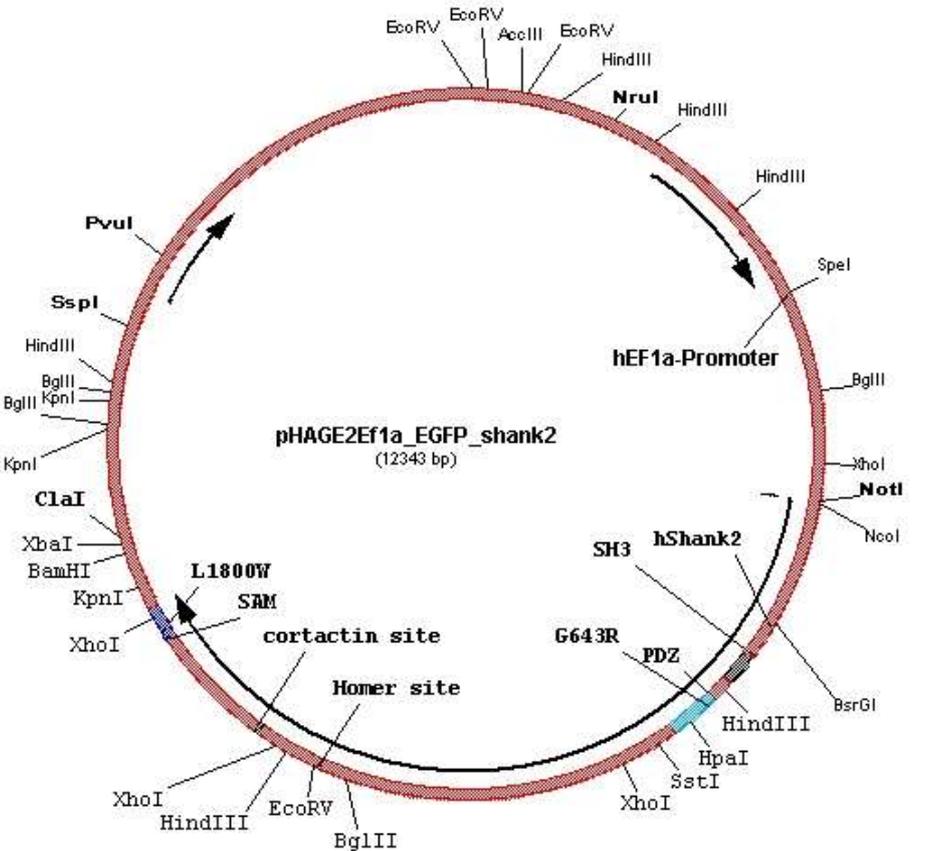
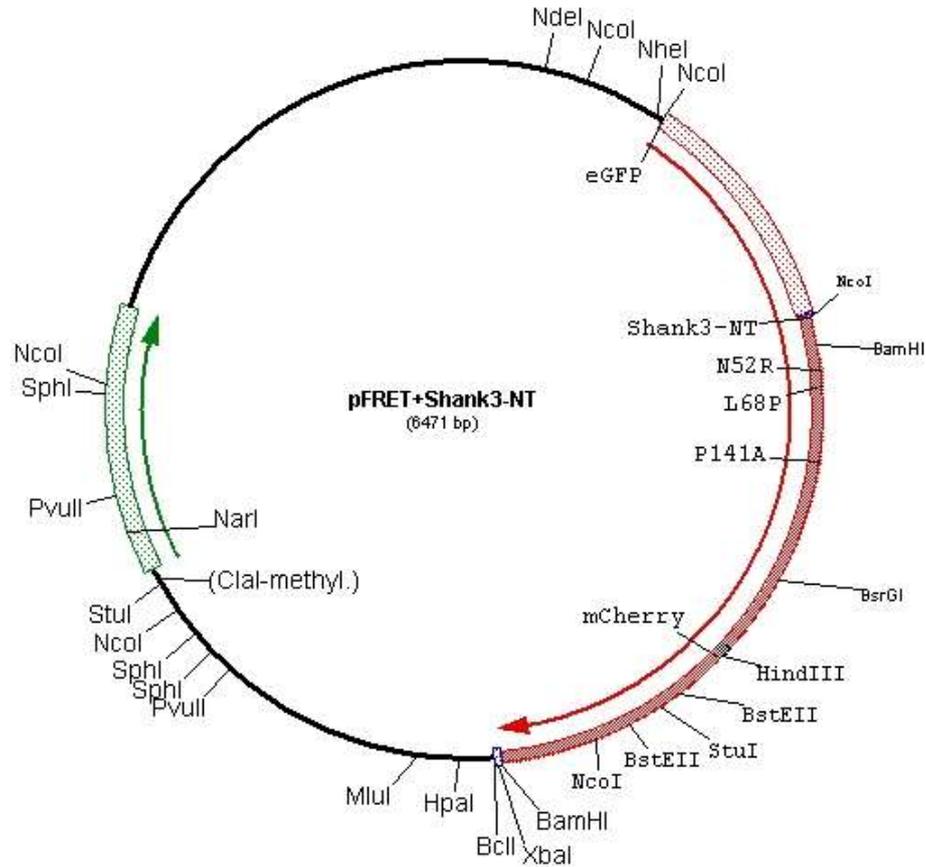
Zitzer, H., Hönck, H.H., Bächner, D., Richter, D., Kreienkamp, H.J., 1999. Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J. Biol. Chem.* 274, 32997–33001. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32997>

# Anhang

## Plasmidkarten von pmRFP Shank3-NT (1-339) sowie von pmRFP Shank3-Ank (75-339)



Plasmidkarten von pFRET-Shank3-NT (1-339) sowie von pEGFP pHAGE-Shank2



## Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp größte Dankbarkeit dafür aussprechen, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und sich der Shankologie zu verschreiben. Vielen Dank für die großartige Betreuung und die vielen interessanten fachlichen sowie fachfremden Gespräche! Es waren drei tolle Jahre in deiner AG Krei.

Auch bei Prof. Dr. Christian Lohr möchte ich mich herzlich für seine Anmerkungen zu meinem Projekt sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein großer Dank gebührt den vielen Kooperationspartnern, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Humangenetik bedanken. Für die hilfreichen Diskussionen in Seminaren und für die hervorragende Arbeitsatmosphäre innerhalb des Instituts!

Ganz besonders herzlich möchte ich Fatemeh Hassani Nia danken, die mich in dieses Projekt vortrefflich eingearbeitet hat und mir zeigte, wie man zu einem echten Shankologen wird.

Ein großes Dankeschön soll auch Hans-Hinrich Hönck zuteil werden, der mich insbesondere bei molekularbiologischen Arbeiten fantastisch unterstützt hat. Es war mir immer eine Ehre, dich beim Wichteln zu beschenken.

Natürlich bedanke ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Kreienkamp: Ilaria, Pia, Joschka, Sarada, Jana, Debora und Edward (nach Sternzeichen angeordnet) – ihr seid alle super! Mit euch zusammen hat die Doktorarbeit sehr viel Spaß gemacht.

Ein riesiges Dankeschön geht an meinen Bruder und meine Eltern. Mama und Papa – ihr würdet einfach alles für mich tun und das ist einfach der Wahnsinn!

Zuletzt danke ich meiner wunderbaren Frau. Für alles. Für bedingungslosen Rückhalt, für größte Unterstützung bei logistischen Herausforderungen, für aufrichtiges Mitleiden, für unfassbar viel Kraft in so vielen Momenten...und natürlich für zwei süße Kinder, die du mal so eben auf die Welt gebracht hast. Du bist immer für mich da. Clara, Ida und Sarah – ich liebe euch!

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## Eidesstattliche Versicherung

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

Daniel Woike

Daniel Woike

Hamburg, den 03.05.2022