

Neurogenetik des Sozialverhaltens

Heterogenität SHANK2-bedingter neuropsychiatrischer Störungen

GU DRUN A. RAPPOLD¹, ROLF SPRENGEL²

¹ ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE HUMANGENETIK, INSTITUT FÜR HUMANGENETIK, UNIVERSITÄT HEIDELBERG

² MAX-PLANCK-FORSCHUNGSGRUPPE „MOLEKULARE NEUROBIOLOGIE“, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE FORSCHUNG, INSTITUT FÜR ANATOMIE UND ZELLBIOLOGIE, UNIVERSITÄT HEIDELBERG

The significance of SHANK proteins in human behaviour is evidenced by the wide spectrum of neuropsychiatric disorders in patients with SHANK mutations and the variety of behavioural impairments of Shank knockout mouse lines. Differentially expressed SHANK isoforms might explain this complexity. The analysis of three conventional and seven conditional Shank2 mouse lines showed that the type of SHANK2 mutation critically determines the physiological and behavioural impairments.

DOI: 10.1007/s12268-020-1337-y
© Die Autoren 2020

■ Eine der größten Herausforderungen im Bereich der kognitiven Neurowissenschaften ist es, die genauen Funktionen der vielfältigen SHANK-Isoformen zu verstehen. Genvarianten in den drei SHANK-Genen (*SHANK1*, *SHANK2* und *SHANK3*) sind anhand zahlreicher genetischer Studien als Ursache geistiger Behinderung (ID) und Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) umfassend belegt.

Dabei führen Varianten in *SHANK1* zu der klinisch schwächsten Form, während Varianten in *SHANK3* zu der klinisch am stärksten ausgeprägten und auch der häufigsten Form einer durch *SHANK* verursachten geistigen Behinderung führen. *SHANK2*-Varianten konnten auch bei Patienten mit Schizophrenie und bipolarer Störung nachgewiesen werden und werden darüber hin-

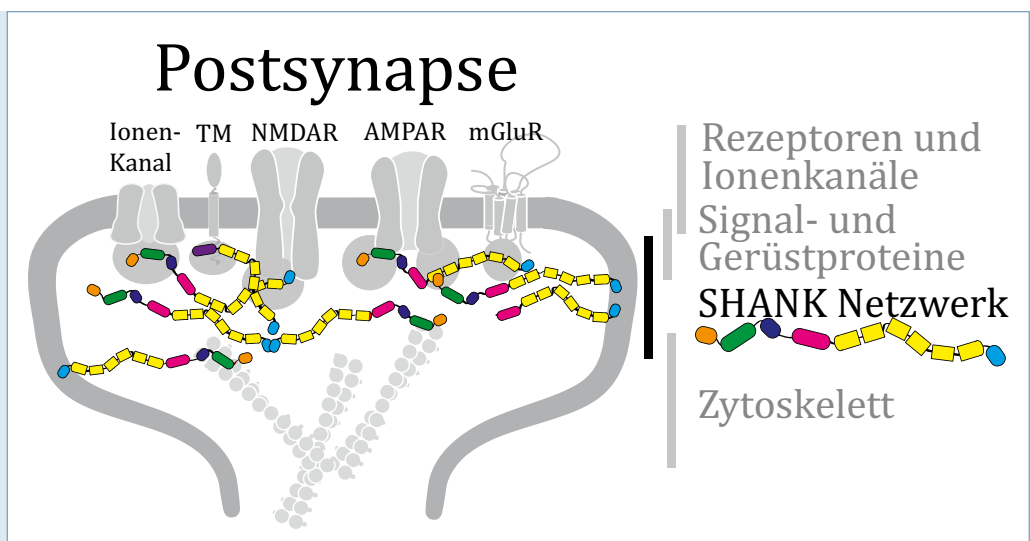
aus auch als ursächlich für das Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) diskutiert. Offensichtlich zeigen damit Patienten mit *SHANK2*-Varianten das breiteste klinische Spektrum. Selbst identische Punktmutationen in *SHANK2* wurden bereits mit unterschiedlichen Diagnosen in Verbindung gebracht. Beispiele sind hier die Mutationen c.1604A/G, p.K535R bei Patienten mit ID oder ASS oder c.1829C/A, p.S610Y bei Patienten mit ID und ASS oder Schizophrenie [1, 2].

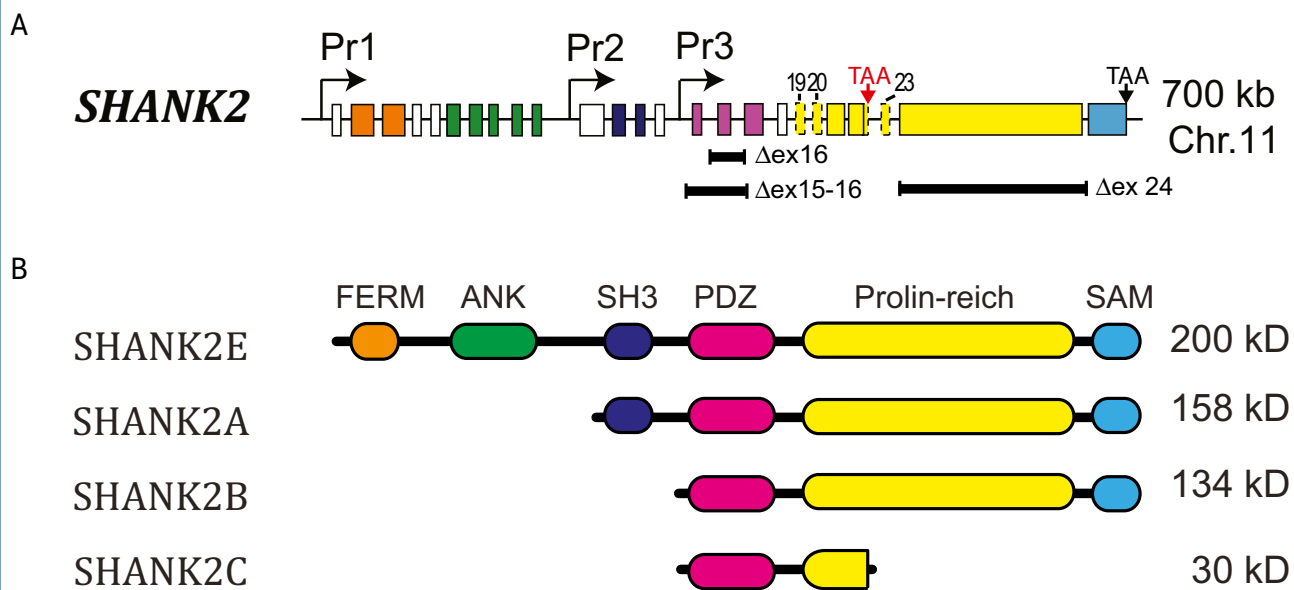
Einige der *SHANK*-Genvarianten sind allerdings nur als Risikofaktoren beschrieben und führen erst dann zu einer Erkrankung, wenn weitere genetische Faktoren oder bestimmte Umwelteinflüsse hinzukommen. Offensichtlich beeinflussen sowohl die genaue Art der genetischen Veränderung als auch deren Zusammenspiel mit anderen genetischen oder epigenetischen Faktoren, welche neuropsychiatrische Erkrankung (z. B. Schizophrenie oder bipolare Störung) entsteht und wie stark sich deren Symptome ausprägen.

Was wissen wir über das SHANK2-Gen?

Wie *SHANK1* und *SHANK3*, so codiert auch das *SHANK2*-Gen für Strukturproteine, die

► **Abb. 1:** SHANK-Strukturproteine dominieren die Anordnung der postsynaptischen Rezeptoren in exzitatorischen Synapsen. Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR), der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor (AMPA) und der metabotrope Glutamatrezeptor, Ionenkanal und der Transmembranrezeptor (TM) sind schematisch gezeigt. Die mit ihnen interagierenden Signal- und Adapterproteine in der postsynaptischen Dichte sind als graue Kreise dargestellt. Das Aktinskelett ist mit grauen Filamenten angedeutet. (Für die Farbcodierung der SHANK2-Proteindomänen siehe Abb. 2.)





▲ **Abb. 2:** SHANK2-Genorganisation und die entsprechenden codierten Proteine. **A,** Das humane *SHANK2*-Gen mit seinen drei Promotoren (Pr1–3). Alternativ gespleißte Exons 19, 20 und 23 sind gestrichelt; Terminationscodons (TAA) sind markiert. Das Terminationscodon in Rot wird aktiviert, sobald die Spleißstelle innerhalb des Exons 22 nicht genutzt wird. Die Mikrodeletionen in *Shank2* der drei *Shank2*-KO-Mauslinien „Δex16“, „Δex15-16“ und „Δex24“ sind markiert. **B,** Hauptisoformen von SHANK2 und deren Protein-Interaktionsdomänen FERM (*Four-point-one*, Ezrin, Radixin, Moesin), ANK (Ankyrin), SH3 (*Src homology 3*), PDZ (PSD95/DLG/ZO1), Prolin-reiche Region und C-terminale SAM-Domäne (steriles Alpha-Motiv). Die SHANK2C-Isoform konnte bei Mäusen nicht nachgewiesen werden.

wesentlich an der Kontrolle der Dendritenmorphologie und der Größe der postsynaptischen Dornen von Nervenzellen im zentralen Nervensystem beteiligt sind. In den Dornfortsätzen bilden SHANK2-Proteine zusammen mit anderen SHANKs ein mit dem Cytoskelett verankertes Strukturgerüst. Glutamatgesteuerte Ionenkanäle, membranständige Rezeptoren und Signal- und Gerüstproteine binden an bestimmte Proteinabschnitte, die Interaktionsdomänen des SHANK-Cytoskletts. Dabei bestimmt die genaue Zusammensetzung des SHANK-Gerüsts die Anordnung und das koordinierte Zusammenwirken der postsynaptischen Signalgeber (**Abb. 1**). Die komplexe Multidomänenstruktur der SHANK-Proteine bietet vielfältige Interaktionsmöglichkeiten. Darüber hinaus führen verschiedene Promotoren und alternatives Spleißen zu zahlreichen Isoformen (für *SHANK2* siehe **Abb. 2**) und damit zu einer variablen und zelltypspezifischen Zusammensetzung des SHANK-Netzwerks. Neben der unterschiedlichen Aktivität der drei *SHANK2*-Promotoren (Pr1, Pr2 und Pr3; **Abb. 1A**) in peripheren humanen Geweben ist auch deren Aktivität in den verschiedenen Gehirnregionen unterschiedlich. Pr3 ist in allen Gehirnbereichen aktiv; Pr1 hauptsächlich im Kleinhirn, etwas schwächer im Hippocampus und im Hinterhauptslappen sogar inaktiv. Der Promotor Pr2 zeigt die geringste Aktivität im Hippocampus. Bemerkenswer-

terweise werden die Exons 19, 20 und 23 nur im Gehirn und nicht in anderen Geweben exprimiert [3].

In Gehirnschnitten oder Primärneuronen von Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die SHANK2-Proteine während der Entwicklung des Nervensystems einen wichtigen Beitrag leisten. Im Vergleich zu *Shank3* sind die Transkriptionswerte von *Shank1* und *Shank2* in Mäusen bereits bei der Geburt hoch und nehmen während der späteren Entwicklung nur geringfügig ab [4]. So findet man SHANK2 in der frühen pränatalen Phase von Mäusen erst in Lamellipodien akkumuliert, später dann im Zellkörper und in Neuriten, und schließlich – etwa drei Wochen nach der Geburt – in Postsynapsen [5]. Aufgrund dieses entwicklungsabhängigen *Shank2*-Expressionsprofils spielen SHANK2-Proteine eine zentrale Rolle beim Umbau der Synapsen während der pränatalen Entwicklung und sind somit wesentlich an der Reifung des Nervensystems beteiligt. Wird die strukturelle Plastizität des SHANK-Netzwerks durch fehlende SHANK2-Isoformen oder durch SHANK2-Mutationen gestört, kommt es zu Komplikationen bei der Entwicklung des Nervensystems.

Was haben wir von Shank2-Mausmodellen gelernt?

Zur experimentellen Analyse der SHANK2-Funktionen wurden in den letzten Jahren

mehrere Mauslinien generiert [2]. Bei den ersten beiden *Shank2*-Knock-out(KO)-Mauslinien wurde jeweils ein Teil der für die PDZ-Domäne codierenden *Shank2*-Gensegmente (Δex16 oder Δex15-16; **Abb. 2A**) entfernt. Dieser genetische Eingriff führte in beiden Fällen, bedingt durch einen Leserasterwechsel, zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation, der mit einem vergleichbaren Funktionsverlust der SHANK2-Proteine verbunden sein sollte. Die Mäuse beider *Shank2*-KO-Mauslinien zeigten auch erhebliche kognitive und soziale Defekte [6, 7]. Jedoch reagierte die hippocampale synaptische Transmission – trotz der sehr ähnlichen Mikrodeletion – ganz unterschiedlich auf die beiden *Shank2*-Gendefekte. So war die Antwort der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) bei der einen Linie erhöht, bei der anderen Linie dagegen erniedrigt. Auch die Anzahl und Dichte der Dornfortsätze an hippocampalen Pyramidenzellen unterschied sich erheblich [6, 7]. Dies wurde als Beweis gewertet, dass die ausgeprägten physiologischen und anatomischen Unterschiede tatsächlich von der Art der eingeführten Mikrodeletion und nicht von genetischen oder epigenetischen Effekten hervorgerufen wurde, was eine vergleichende Analyse beider Gendelektionen nach Rückkreuzung der beiden Linien in einen fast identischen genetischen Hintergrund letztendlich bestätigte. Auch in dieser Studie wirkten sich die beiden

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

Tab. 1: Fünf Punktmutationen in codierenden Regionen (c.) des *SHANK2*-Gens, die in SHANK2-Proteinen zu Aminosäureraustauschen (p.) führen. Die Mutationen sind mit mehreren unterschiedlichen psychiatrischen Störungen assoziiert. ASS: Autismus-Spektrum-Störung; ID: geistige Behinderung (*intellectual disability*); SCZ: Schizophrenie; STP: Schizotypische Persönlichkeitsstörung; n. a.: nicht analysiert (modifiziert nach [2]).

SHANK2-Mutation	Anzahl der Patienten	Aminosäureaustausch der Patienten	Neuropsychiatrische Symptome bei Anzahl der Patienten	Überträger
c.1604 A > G	2	p.K535R	1 ASS 1 ID	n. a. n. a.
c.1730 C > T	7	p.A577V	5 SCZ 1 STP 1 schizoaffektive Störung	Mutter Mutter Mutter
c.1759 C > T	2	p.P587S	1 Autismus 1 ID	Mutter n. a.
c.1829 C > A	2	p.S610Y	1 katatone SCZ 1 ID mit autistischen Zügen	n. a. Vater
c.5191 G > T	4	p.A1731S	3 paranoide SCZ 1 hebephrene SCZ	Mutter Mutter

Mikrodeletionen wieder unterschiedlich auf die synaptische Transmission im Hippocampus aus. Die „ Δ ex15-16“-Mikrodeletion korrelierte aufgrund reduzierter Rezeptorspiegel für die γ -Aminobuttersäure (GABA_A-Rezeptoren) mit einer Disinhibition hippocampaler Aktivität. Die „ Δ ex16“-Mikrodeletion hatte jedoch keinen Einfluss auf die inhibitorische Reizweiterleitung [8].

Einige Jahre später wurden die Mikrodeletionen „ Δ ex15-16“ und „ Δ ex16“ nur in Purkinje-Zellen des Kleinhirns eingeführt. Wiederum lieferte die vergleichende Verhaltensanalyse keine übereinstimmenden Resultate. Erneut wurden mutationsspezifische Phänotypen auf Molekular- und auf Verhaltensebene beobachtet. Bei Mäusen mit Purkinje-Zellspezifischer „ Δ ex16“-*Shank2*-Mikrodeletion wurden Mängel beim Erlernen motorischer Fähigkeiten und im Sozialverhalten beobachtet [9]. Im gleichen Zelltyp verursachte die „ Δ ex15-16“-Mikrodeletion Motorkoordinationsprobleme und vermehrte stereotypische Bewegungen, jedoch keinen abnormen Umgang mit Artgenossen [10].

Doch nicht nur die Art der *SHANK2*-Mutation, sondern auch der Zelltyp, in dem die *SHANK2*-Mutation auftritt, bestimmt, wie die Gehirnfunktion beeinflusst wird. Wurde die „ Δ ex15-16“-Mikrodeletion nur in erregenden Zellen induziert, so konnten bei den Mäusen Interaktionsdefizite, Hyperaktivität und ängstliches Verhalten beobachtet werden. In inhibitorischen Zellen führte die identische Mikrodeletion lediglich zu einer deutlich reduzierten verbalen Kommunikation und intensiverer Fellpflege [11]. Auch das Ver-

halten einer weiteren genetisch veränderten *Shank2*-KO-Mauslinie mit einer Mikrodeletion des codierenden Gensegmentes für die Prolin-reiche Region von *Shank2* (Δ ex24; **Abb. 2A**) ist untypisch für ASS-Mausmodelle und erinnert eher an eine bipolare Störung mit manischer Überaktivität und normalen sozialen Kontakten zu Artgenossen [12].

Wie können die Unterschiede bei den verschiedenen SHANK2-Mausmodellen erklärt werden?

Die Heterogenität der beschriebenen *Shank2*-KO-Mauslinien erlaubt den wichtigen Rückschluss, dass es eine große Variabilität, aber keinen umfassend klar definierten „SHANK2-Phänotyp“ gibt. Hier bestimmt die Art der Mutationen, ob und wie stark soziale Interaktion und die kognitiven Fähigkeiten eingeschränkt sind. Auch unterschiedliche Expressionsspiegel verschiedener verkürzter SHANK2-Proteine, die durch Mikrodeletionen entstehen, können das Gleichgewicht der SHANK-Proteine empfindlich stören. Welche Bedeutung einer Verschiebung dieses Gleichgewichts tatsächlich zukommt, ist derzeit ungewiss. Auswirkungen eines experimentell gestörten SHANK-Proteingleichgewichts konnten bei der Virus-gesteuerten Überexpression der SHANK2A(R841X)-Variante, der die PDZ-, Prolin-reiche- und SAM-Domänen fehlen, bereits beobachtet werden. Hier führte der Funktionsverlust von SHANK2 in hippocampalen Nervenzellen zu einer frühreifen Filopodien-ähnlichen Struktur der Dendritfortsätze und die SHANK2A(R841X)-

Überexpression zu einer geringeren synaptischen Transmission [3].

Schlussfolgerungen

Die unterschiedlichen Veränderungen der synaptischen Aktivität und Plastizität sowie des Sozialverhaltens bei *Shank2*-KO-Mäusen zeigen deutlich, dass eine physiologisch kontrollierte *SHANK*-Expression für die Organisation einer intakten postsynaptischen Versorgung an exzitatorischen Synapsen essenziell ist. Strukturveränderungen des SHANK-Netzwerks führen zu einer Neuordnung der postsynaptischen Rezeptoren, Kanäle und Rezeptor-interagierenden Signalproteine und damit zu messbaren Veränderungen der glutamatergen Transmission. Ein gestörtes Gleichgewicht der verschiedenen SHANK-Proteine beeinträchtigt sowohl den entwicklungs- als auch den erfahrungsbedingten Umbau der Synapsen und damit die Kommunikation verschiedener, weit verteilter Neuronenverbände. Bei den verschiedenen *Shank2*-KO-Mauslinien mit verkürzten SHANK2-Isoformen wird die Homöostase von SHANK-Proteinen in ihrer Funktion als „Synapsenorganisator“ mutationsspezifisch beeinträchtigt. Somit können verschiedene *Shank2*-Mutationen unterschiedliche und teilweise gegensätzliche Fehlfunktionen in der Synapse und damit im Verhalten auslösen. Dies im Detail zu verstehen, ist Aufgabe zukünftiger experimenteller Studien. ■

Literatur

- [1] Berkel S, Marshall CR, Weiss B et al. (2010) Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet* 42:489–491
- [2] 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* 11:240
- [3] Leblond CS, Heinrich J, Delorme R et al. (2012). Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genet* 8:e1002521
- [4] Boeckers TM, Segger-Junius M, Iglauer P et al. (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
- [5] Boeckers TM, Kreutz MR, Winter C et al. (1999) Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci* 19:6506–6518
- [6] Schmeisser MJ, Ey E, Wegener S et al. (2012) Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature* 486:256–260
- [7] Won H, Lee HR, Gee HY et al. (2012) Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature* 486:261–265
- [8] Lim CS, Kim H, Yu NK et al. (2017) Enhancing inhibitory synaptic function reverses spatial memory deficits in Shank2 mutant mice. *Neuropharmacol* 112:104–112
- [9] Ha S, Lee D, Cho YS et al. (2016) Cerebellar Shank2 regulates excitatory synapse density, motor coordination, and specific repetitive and anxiety-like behaviors. *J Neurosci* 36:12129–12143

- [10] Peter S, Ten Brinke MM, Stedehouder J et al. (2016) Dysfunctional cerebellar Purkinje cells contribute to autism-like behaviour in Shank2-deficient mice. *Nat Commun* 7:12627
- [11] Kim R, Kim J, Chung C et al. (2018) Cell-type-specific Shank2 deletion in mice leads to differential synaptic and behavioral phenotypes. *J Neurosci* 38:4076–4092
- [12] Pappas AL, Bey AL, Wang X et al. (2017) Deficiency of Shank2 causes mania-like behavior that responds to mood stabilizers. *JCI Insight* 2:e92052
- [13] Berkel S, Tang W, Trevino M et al. (2012) Inherited and *de novo* SHANK2 variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology. *Hum Mol Genet* 21:344–357

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. rer. nat. Gudrun A. Rappold
Abteilung für Molekulare Humangenetik
Institut für Humangenetik
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 366
D-69120 Heidelberg
Gudrun.Rappold@med.uni-heidelberg.de

Dr. Rolf Sprengel
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 307
D-69120 Heidelberg
sprengel@mpimf-heidelberg.mpg.de

AUTOREN



Gudrun A. Rappold

Jahrgang 1954. Biologiestudium an der Universität Heidelberg; dort 1984 Promotion in Biologie. 1984–1988 Postdoktorandin bei Prof. Dr. H. Cooke an der MRC Unit, Universität von Edinburgh, UK, und Prof. Dr. H. Lehrach am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg und am Imperial College (ICRF) in London, UK. Seit 1989 Arbeitsgruppenleiterin am Institut für Humangenetik, Universität Heidelberg. 1993 Habilitation. Seit 2003 Ordinaria für Molekulare Humangenetik am Institut für Humangenetik, Universität Heidelberg.



Rolf Sprengel

Jahrgang 1955. Biologiestudium an der Universität Heidelberg; dort 1983 Promotion in Biologie. 1984–2000 Postdoktorand bei Prof. Dr. H. Schaller an der Universität Heidelberg, Prof. Dr. H. Varmus an der University of California San Francisco (UCSF), Prof. Dr. H. Will am Max-Planck-Institut für Biochemie, München, und Prof. Dr. P. H. Seeburg am Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH) der Universität Heidelberg und am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg. Ab 2001 unabhängiger Arbeitsgruppenleiter der Max-Planck-Gesellschaft am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg.