

Zusammenfassung der Dissertation

Christine Unsicker

Dr. med.

„Deciphering the role of *SHANK2* in SH-SY5Y cells during early neuronal development”

Fach: Humangenetik

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Rappold

SHANK2 gehört zu der Familie der *SHANK*-Gene, welche für postsynaptische Ankerproteine kodieren. Sie kommen in glutamatergen Neuronen vor und sind essenziell für Entwicklung und Funktion von Synapsen. Mutationen im *SHANK2*-Gen konnten mit geistiger Behinderung und Autismus-Spektrum-Störung in Verbindung gebracht werden. Nichtsdestotrotz konnten die konkreten Mechanismen, welche zum Auftreten von Autismus in Zusammenhang mit dem Verlust von *SHANK2* führen noch nicht zufriedenstellend aufgedeckt werden.

In der vorliegenden Studie habe ich die funktionellen Auswirkungen von *SHANK2*-Mutationen auf Zellmorphologie, Zellzyklusverhalten und neuronalen Differenzierungseigenschaften während der frühen neuronalen Differenzierung untersucht. Als Modell dienten hierfür SH-SY5Y-Neuroblastom-Zelllinien mit CRISPR/Cas9 induzierten mono- und biallelen *SHANK2*-Mutationen. Weiterhin etablierte ich ein von Chiocchetti et al. (2016) publiziertes Protokoll für die neuronale Differenzierung von SH-SY5Y Zellen, welches mit fetaler kortikaler Entwicklung vergleichbare Transkriptom-Expressionslevel von bekannten Autismus-Risikogenen erzielen kann. Mithilfe von Transkription- und Proteomanalysen wurde die Expression von Markern für neuronale Entwicklung ebenso wie jene von Glutamatrezeptoren, welche bekanntermaßen mit *SHANK2* interagieren, untersucht sowie alle Mitglieder der *SHANK*-Familie. Darüber hinaus wurde die Auswirkungen der *SHANK2*-Expression auf das Mitoseverhalten und die Fähigkeit der Zellen während der neuronalen Differenzierung Neuriten zu bilden untersucht. Ich konnte eine eingeschränkte Expression von neuronalen, glutamatergen, GABAergen und dopaminergen Markern auf mRNA- und Proteinlevel feststellen. Des Weiteren zeigten *SHANK2* Varianten ein pathologisches Muster bei Zellproliferation und -apoptose sowie eine Störung des Neuritenwachstums. Dies weist auf eine Störung des komplexen Gleichgewichts neuronaler Signalwege durch den Verlust des

Ankerproteins SHANK2 hin. Aus meinen Ergebnissen lässt sich schließen, dass SHANK2 bereits während der frühen neuronalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt. Darüber hinaus konnte ich Hinweise auf zelluläre Rettungsmechanismen für die synaptische Homöostase in der heterozygoten *SHANK2*-Mutantenzelllinie finden. Interessanterweise deuten diese Ergebnisse auf eine mögliche zusätzliche präsynaptische Rolle von *SHANK2* hin, was die Vermutung nahelegt, dass *SHANK2* einen noch umfassenderen Einfluss auf die synaptische Funktion haben könnte als bisher angenommen wurde.

Zusammenfassend konnte ich Hinweise erhalten, dass der Verlust eines oder beider *SHANK2* Allelen zu einer Beeinträchtigung der frühen embryonalen Neuroentwicklung führen kann und so eine eingeschränkte Formierung des neuronalen Netzwerkes zur Folge hat.

Um die Folgen von patientenspezifischen *SHANK2*-Mutationen bei Patienten genauer zu untersuchen habe ich Zelllinien mit einer *SHANK2*-Nonsense-Mutation (*SHANK2_R841X*) generiert, die zuvor bei einer Person mit Autismus-Spektrum-Störung identifiziert wurde. Dazu habe ich eine Weiterentwicklung der CRISPR/Cas9-Genomeditierung, die sogenannte Basen-Editierung, verwendet. Basen-Editierung ermöglicht eine gezielte und dauerhafte Umwandlung von G-C- in A-T-Basenpaare ohne die zuvor bei der konventionellen CRISPR/Cas9 Technologie notwendigen doppelsträngigen DNA-Brüche. Diesen folgen bei der herkömmlichen CRISPR/CAS9 Methode zelleigenen Reparaturmechanismen, die in dem unspezifischen und zufälligen Einfügen von Basen resultieren. Einer der größten Vorteile der Basen-Editierung ist daher die Vermeidung jener willkürlichen und ungezielten Basenmutationen und damit eine höhere Editiereffizienz sowie eine bessere Steuerbarkeit im Vergleich zu herkömmlichem CRISPR/Cas9 System.

Zunächst habe ich die Funktion der Methode nachgewiesen, indem es gelungen ist, patientenspezifische *SHANK2*-Mutationen in HEK293-T-Zellen einzubringen. Anschließend optimierte ich den Transfektionsprozess in SH-SY5Y-Zellen, um Klone zu erzeugen, die für die neuronale Differenzierung und damit für die Erforschung frühneuronaler Prozesse im Zusammenhang mit Autismus geeignet waren. Auf diese Weise konnten erfolgreich vier SH-SY5Y-Zelllinien generiert werden, die die Patientenmutation *SHANK2_R841X* tragen.

Zusammenfassend kann ich sagen, dass es mir gelungen ist vier Zelllinien zu generieren, die eine patientenspezifische *SHANK2*-Mutation tragen. Die gewonnenen Zelllinien können die Identifizierung krankheitsspezifischer molekularen Folgen einer *SHANK2*-Mutation in Patienten erleichtern und bieten die Möglichkeit einen Schritt näher an die Entwicklung geeigneter Behandlungsstrategien von ASD zu kommen.