

Neurogenetik

Autismus – wenn Nervenzellen kontaktscheu sind

NILS BROSE

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN, GÖTTINGEN

Erkrankungen aus dem Autismus-Spektrum – *autism spectrum disorders* oder ASDs – sind häufig auftretende Entwicklungsstörungen des Nervensystems. Epidemiologische und humangenetische Studien lassen auf eine genetische Prädisposition als wesentliche Ursache von ASDs schließen. In einer Reihe jüngst charakterisierter Fälle monogen erblicher ASDs sind Gene betroffen, deren Proteinprodukte an der Ausbildung glutamaterger Synapsen zwischen Nervenzellen beteiligt sind. In Mausmodellen mit Deletionen dieser Gene ist die synaptische Signalübertragung fundamental gestört. Offenbar sind also zumindest einige ASD-Formen Synaptopathien.

Epidemiologie und Genetik von ASDs

■ Unter dem Begriff *autism spectrum disorders* oder ASDs wird eine Gruppe von Krankheiten zusammengefasst, zu der neben dem prototypischen Autismus das Asperger-Syndrom, der atypische Autismus (*pervasive developmental disorder not otherwise specified* – PDD-NOS) sowie syndromische Formen des Autismus gehören. Die Prävalenz von typischem Autismus liegt bei etwa 0,2 Prozent. Betrachtet man das gesamte ASD-Spektrum, liegt die entsprechende Rate bei 0,6 Prozent^[1].

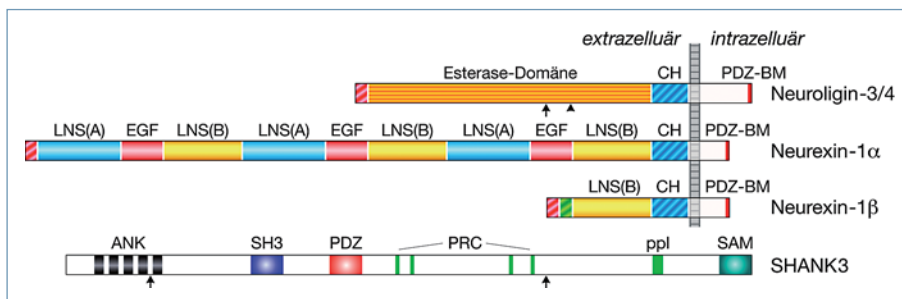
Dass ASDs ganz wesentlich durch genetische Faktoren verursacht werden, konnte in Zwillingsstudien, Familienanalysen und humangenetischen Untersuchungen nachgewiesen werden. Die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen etwa liegt je nach Definition der Phänotypen bei bis zu 92 Prozent^[1]. Genomweite Suchen nach ASD-Suszeptibilitätsgenen und zytogenetischen Abnormalitäten bei ASDs ergaben Hinweise für ASD-Lozi auf allen Chromosomen. Auch die Assoziation von ASD-verbundenen Symp-

tomen mit komplexeren monogen erblichen Syndromen wie etwa dem Rett-Syndrom, dem *Fragile-X Syndrome*, der tuberösen Hirnsklerose oder der Neurofibromatose vom Typ 1 weist auf einen elementaren genetischen Beitrag zur Ätiologie von ASDs hin^[2-4].

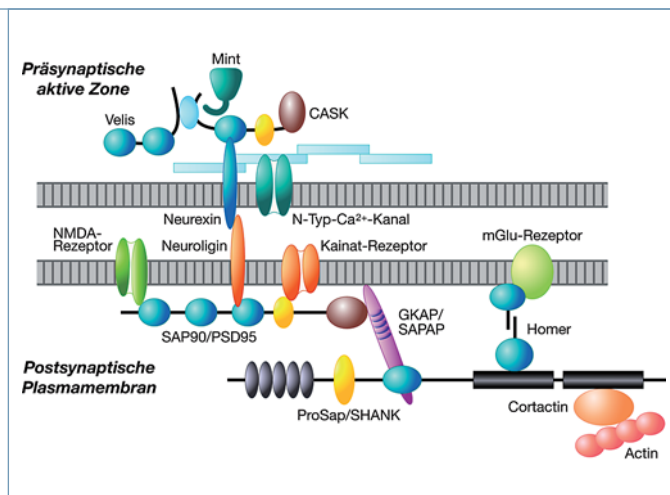
Monogen erbliche ASD-Formen

Monogen erbliche, nicht-syndromale Formen von ASDs waren lange Zeit unbekannt. Eine Reihe neuester Studien hat diese Situation jedoch grundlegend geändert. Die erste Entdeckung zweier klar abgrenzbarer Mutationen als Ursachen für ASDs gelang einem französisch-schwedischen Konsortium aus Humangenetikern und Psychiatern im Rahmen einer Studie an Geschwisterpaaren mit typischem Autismus oder Asperger-Syndrom^[5]. Bei zwei Brüderpaaren wurden dabei Mutationen in den X-chromosomalen Genen *NLGN3* beziehungsweise *NLGN4* entdeckt. Die beiden Gene kodieren für zwei neuronale synaptische Adhäsionsproteine, Neuroligin-3 und Neuroligin-4 (NL-3, NL-4), die als Regulatoren der Synapsenentwicklung und Synapsenfunktion gelten^[6-9]. Neuroligine (NLs) sind Typ-1-Transmembranproteine mit einer extrazellulären, katalytisch inaktiven Serinesterase-Domäne und einer kurzen intrazellulären Domäne, die unter anderem an PDZ-Domänen verschiedener Gerüstproteine binden kann (**Abb. 1 und 2**). Die beschriebenen Mutationen führen zu einem Funktionsverlust von NL-3 und NL-4^[10, 11]. Dass Mutationen in *NLGN3* und *NLGN4* ASDs und geistige Behinderung verursachen können, wurde in zwei Folgestudien bestätigt^[12, 13]. Allerdings sind durch NL-Mutationen verursachte ASD-Formen eher selten, denn in mehreren systematischen Analysen an ASD-Patientengruppen konnten keine Mutationen in *NLGN*-Genen nachgewiesen werden^[14-17].

In einer zweiten Studie entdeckte dasselbe Konsortium französischer und schwedischer Forscher drei verschiedene ASD-verursachende Mutationen im *SHANK3*-Gen^[18]. *SHANK3* gehört zu einer Familie wichtiger



▲ **Abb. 1:** Domänenstrukturen von NL-3, NL-4, NX-1 α , NX-1 β und SHANK3. Pfeile unter den jeweiligen Domänenstrukturen zeigen die Sequenzbereiche von NL-4 und SHANK3 an, in denen die in autistischen Patienten identifizierten Mutationen zu Abbrüchen führen^[9, 22]. Die Position der identifizierten *missense*-Mutation R451C in NL-3^[9] ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. ANK: Ankyrin-repeats, CH: O-Glykosylierungsstellen, EGF: EGF-ähnliche Domäne, LNS: *laminin-A/neurexin/sex-hormone-binding-globulin repeats*, PDZ: *postsynaptic-density-95/discs-large/zona-occludens-1*-Domäne, PDZ-BM: PDZ-Domänen-Bindungsmotiv, ppl: Cortactin-Bindungsdomäne, PRC: prolinreiche Cluster, SAM: *sterile alpha motif*, SH3: Src-Homologiedomäne 3.



◀ **Abb. 2:** NLS bilden mit NXs eine transsynaptische Adhäsionsbrücke, die eine zentrale Rolle bei der Ausbildung funktionell essentieller synaptischer Proteinnetzwerke spielt. Über intrazelluläre Interaktionen mit Gerüst- und Zytoskelettproteinen rekrutieren NXs spannungabhängige Ca^{2+} -Kanäle und Komponenten des Sekretionsapparats zur Präsynapse. Auf analoge Weise rekrutieren postsynaptische NLS postsynaptische Rezeptoren. SHANK-Proteine sind postsynaptische Gerüstproteine, die ebenfalls über definierte Protein-Protein-Interaktionen zur Rekrutierung postsynaptischer Rezeptoren und anderer Signalproteine sowie zu deren Verankerung im Zytoskelett beitragen. CASK: calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase, GKAP: guanylate kinase domain-associated protein, mGlu-Rezeptor: metabotroper Glutamaterezeptor, Mint: *Munc 18 interacting protein*, NMDA: N-Methyl-D-Aspartat, ProSAP: proline-rich synapse-associated protein, PSD95: postsynaptic density protein of 95 kDa, SAP90: synaptosome associated protein of 90 kDa, SAPAP: SAP90/PSD95-associated protein, SHANK: SH3 domain and ankyrin repeat containing protein, Veli: vertebrate Lin 7.

Gerüstproteine glutamaterger Synapsen und interagiert über Ankyrin-repeats, SH3-, PDZ- und sterile-alpha-motif-Domänen sowie prolinreiche Regionen mit verschiedenen Gerüstproteinen, Zytoskelettproteinen und Rezeptoren (**Abb. 2**). Bis auf eine Ausnahme führen die beschriebenen Mutationen zu einem Funktionsverlust von SHANK3. Besonders interessant ist ein Mutationstyp, bei dem es bei einem Geschwisterpaar entweder zu einer terminalen Deletion in 22qter oder zu einer entsprechenden 22qter-Trisomie kommt, wobei die 22qter-Deletion zu einem hemizygoten Verlust des SHANK3-Gens und Autismus mit schwerer Sprachstörung führt, während die entsprechende Trisomie ein Asperger-Syndrom mit besonderer Sprachbegabung verursacht.

NL-3, NL-4 und SHANK3 sind Komponenten eines Proteinnetzwerks, das für die molekulare Organisation glutamaterger Synapsen in Neuronen verantwortlich ist (**Abb. 2**). Dass Funktionsverlust-Mutationen in allen drei entsprechenden Genen zu ASDs führen, zeigt, dass eine Fehlentwicklung oder eine Fehlfunktion glutamaterger Synapsen ursächlich an der Entstehung von ASDs beteiligt sein kann. Diese Annahme hat jüngst durch eine systematische Studie über Genkopienzahl-Variationen bei ASD überzeugende Unterstützung erhalten^[19]. Neben einer Reihe anderer Mutationen wurde im Rahmen dieser Studie bei zwei Schwestern eine hemizygoten Deletion identifiziert, die eine Reihe kodierender Exone von NRXN1 eliminiert. Das NRXN1-Gen kodiert mithilfe zweier Promotoren zwei Typen von Neurexin-1-Proteinen (NX-1 α und NX-1 β). Beide NX-1-Varianten sind Typ-1-Transmembranproteine mit unterschiedlich langen extrazellulären Bereichen, die LNS-Domänen und EGF-ähnliche Domänen enthalten, und derselben kurzen carboxyterminalen Domäne, die wie im Fall der NLS unter anderem an PDZ-Domänen verschiedener Gerüstproteine binden kann

(**Abb. 1**). In diesem Zusammenhang besonders bemerkenswert ist der Umstand, dass NXs mit NLS eine transsynaptische adhäsive Verbindung herstellen, die die Assemblierung und Positionierung des präsynaptischen Transmitter-Sekretionsapparats und des postsynaptischen Signaltransduktionsapparats an glutamatergen Synapsen koordiniert (**Abb. 2**). Die beschriebene Deletion im NRXN1-Gen führt zu einem Verlust der NX-1 α - und NX-1 β -Expression. In derselben^[19] sowie in einer methodisch ähnlichen Studie über *de novo*-Variationen der Genkopienzahl in autistischen Patienten^[20] wurden eine Reihe weiterer möglicher ASD-Gene identifiziert, deren Produkte direkt oder indirekt die synaptische Transmission an glutamatergen Synapsen beeinflussen können^[19].

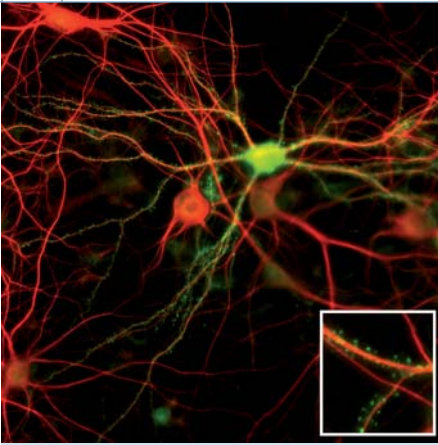
NXs, NLS und SHANKs in glutamatergen Synapsen

Synapsen sind strukturell und funktionell hoch komplexe Kontaktstellen zwischen Nervenzellen (**Abb. 3**). Sowohl der präsynaptische Transmitter-Sekretionsapparat als auch der postsynaptische Signalrezeptionsapparat bestehen aus Dutzenden von Proteinen (**Abbildung 2** zeigt eine Auswahl), die für die räumliche und zeitliche Genauigkeit synaptischer Übertragungsprozesse und ihre Modulation etwa bei Adaptations- und Gedächtnisprozessen verantwortlich sind. Das synaptische *trafficking*, die prä- und postsynaptische Verankerung und die Funktion dieser Proteine werden durch eine Kombination aus Zelladhäsionsproteinen und Gerüstproteinen gewährleistet, die die prä- und postsynaptischen Kompartimente einer Synapse strukturell zusammenhalten und funktionell aufeinander abstimmen. NXs, NLS und SHANKs sind für den Aufbau und die Funktion dieses Proteinnetzwerks von elementarer Bedeutung (**Abb. 2**).

NXs und NLS – auch die als Produkte von ASD-Genen identifizierten Proteine NX-1, NL-

3 und NL-4 – bilden eine transsynaptische Adhäsionsbrücke, die als „Kristallisationspunkt“ für die Rekrutierung prä- und postsynaptischer Proteine dient. Mausgenetische Studien zeigen, dass eine Deletion aller α -NXs zu einer präsynaptischen Fehlfunktion spannungabhängiger Ca^{2+} -Kanäle^[21] und zu einem partiellen Verlust postsynaptischer NMDA-Rezeptoren^[22] führt. Aufgrund dieser Veränderungen, die durch die Unterbrechung der indirekten Interaktion von NXs mit Ca^{2+} -Kanälen (über das Zytoskelett) und NMDA-Rezeptoren (über NLS und PSD-95) (**Abb. 2**) in NX-defizienten Tieren erklärt werden kann, kommt es zu einer postnatal letalen Störung der synaptischen Signalübertragung. Die Elimination von NX-1 in ASD-Patienten führt wahrscheinlich in Analogie zu den Befunden an NX-defizienten Mäusen zu einer ähnlichen, allerdings weniger stark ausgeprägten synaptischen Fehlfunktion, die für die ASD-Symptome verantwortlich gemacht werden kann.

Die gleichzeitige Elimination von NL-1, NL-2 und NL-3 in mutanten Mäusen verursacht ähnlich wie im Fall der α -NX-Deletion eine postnatal letale synaptische Fehlfunktion, die zumindest teilweise auf den partiellen Verlust postsynaptischer Glutamaterezeptoren vom NMDA- und AMPA-Typ zurückzuführen ist^[23]. Die selektive Deletion von NL-1, das den beiden in ASD involvierten NLS funktionell sehr ähnlich ist^[9], verursacht mildere phänotypische Veränderungen, die durch einen partiellen Verlust postsynaptischer NMDA-Rezeptoren und eine entsprechend gestörte synaptische Übertragung charakterisiert sind^[24]. Der Verlust postsynaptischer NMDA- und AMPA-Rezeptoren nach NL-Deletion kann durch deren indirekte Interaktion erklärt werden, die im Fall von NMDA-Rezeptoren über PSD-95 und im Fall von AMPA-Rezeptoren über PSD-95 und das Gerüstprotein Stargazin erfolgt und in den Mausmutanten gestört ist (**Abb. 2**). Die phänotypischen Konsequenzen der Deletion von



▲ **Abb. 3:** NL-1 in Nervenzellen. Eine der gezeigten Nervenzellen (rot) wurde genetisch so manipuliert, dass sie eine grün fluoreszierende NL-1-Variante bildet. Besonders in der Teilvergrößerung (rechts unten) ist sichtbar, dass NL-1 (grün) in postsynaptischen Dornen zu finden ist, die aus der Dendritenoberfläche herausragen. Bild: Thomas Dresbach (Universität Heidelberg) und Nils Brose.

NL-3 oder NL-4 in autistischen Patienten sollten denen der NL-1-Deletion in Mäusen ähnlich sein. Tatsächlich zeigen Pilotexperimente, dass NL-4-defiziente Mäuse mit ASD vergleichbare Defizite im Sozialverhalten aufweisen.

Hinsichtlich der Funktion von SHANK3 existieren derzeit keine Daten aus mausgenetischen Experimenten. Für alle bekannten SHANK-Isoformen wurden Interaktionen mit verschiedenen Komponenten des postsynaptischen Signaltransduktionsapparats nachgewiesen^[25–27]. Funktionelle Studien an kultivierten Neuronen legen den Schluss nahe, dass SHANK-Proteine sowohl an der Ausbildung postsynaptischer Dornen glutamaterger Synapsen als auch über die Interaktion mit anderen Gerüst- und Zytoskelettproteinen an der Rekrutierung postsynaptischer Rezeptoren beteiligt sind. Angesichts dieser Befunde ist davon auszugehen, dass ein Verlust der Funktion von SHANK3 *in vivo*, wie er bei den beschriebenen autistischen Patienten auftritt, zu einer Reduktion postsynaptischer Dornen und einer gestörten synaptischen Transmission führt, während eine SHANK-3-Überexpression, wie sie im Fall des Patienten mit 22qter-Trisomie und einem zusätzlichen SHANK-3-Gen zu erwarten ist, den gegenteiligen Effekt haben sollte.

NXs, NLs und SHANKs – Trio infernale oder Spitze des Eisbergs?

Ob die Befunde aus Studien über *NLGN3*, *NLGN4*, *NRXN1*- und *SHANK3*-Mutationen bei ASD generalisierbar sind und zu einer allgemeinen Erklärung der Ätiologie von ASDs

herangezogen werden können, ist derzeit noch unklar. Offensichtlich ist, dass eine Reihe anderer Mutationen, die wahrscheinlich nicht direkt den glutamatergen oder irgendeinen anderen Typ synaptischer Signalübertragung stören, ebenfalls zu ASD führen können^[4, 19, 20]. Das bedeutet allerdings nicht, dass in diesen Fällen nicht auch die synaptische Signalübertragung im Nervensystem beeinflusst ist. Vielmehr ist klar, dass die Störung fast jeden neuronalen Prozesses ultimativ auch zu Veränderungen der synaptischen Übertragungseigenschaften führt.

In der Gesamtschau zeigen jüngste genetische Untersuchungen über monogene Ursachen von ASDs und Untersuchungen an entsprechenden Mausmutanten, dass eine Fehlfunktion glutamaterger Synapsen ursächlich an der Entstehung von ASDs beteiligt sein kann. *NLGN3*, *NLGN4*, *NRXN1*- und *SHANK3*-Mutationen als Ursachen von ASDs mögen nur die Spitze des Eisbergs darstellen. Allerdings zeigen die entsprechenden Befunde deutlich, dass ein die Funktion glutamaterger Synapsen regulierendes Proteinnetzwerk unter Beteiligung von NL-3, NL-4, NX-1 und SHANK3 (**Abb. 2**) im Zentrum eines wichtigen ASD-Suszeptibilitätsmechanismus steht. Die Verfügbarkeit entsprechend mutierter Mauslinien bietet einen idealen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Diagnose- und Therapieverfahren für ASDs. ■

Literatur

- [1] Fombonne, E. (2005): *J. Clin. Psychiatry* 66 (Suppl. 10): 3–8.
- [2] Freitag, C. M. (2007): *Mol. Psychiatry* 12: 2–22.
- [3] Vorstman, J. A., Staal, W. G., van Daalen, E., van Engeland, H., Hochstenbach, P. F., Franke, L. (2006): *Mol. Psychiatry* 11: 18–28.
- [4] Persico, A. M., Bourgeron, T. (2006): *Trends Neurosci.* 29: 349–358.
- [5] Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., Paris Autism Research International Sibpair Study (2003): *Nat. Genet.* 34: 27–29.
- [6] Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., Südhof, T. C. (1995): *Cell* 81: 435–443.
- [7] Song, J. Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C., Brose, N. (1999): *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 1100–1105.
- [8] Chih, B., Engelman, H., Scheffele, P. (2005): *Science* 307: 1324–1328.
- [9] Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W., Craig, A. M. (2004): *Cell* 119: 1013–1026.
- [10] Comoletti, D., De Jaco, A., Jennings, L. L., Flynn, R. E., Gaietta, G., Tsigelny, I., Ellisman, M. H., Taylor, P. (2004): *J. Neurosci.* 24: 4889–4893.
- [11] Chih, B., Afridi, S. K., Clark, L., Scheffele, P. (2004): *Hum. Mol. Genet.* 13: 1471–1477.
- [12] Laumonier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M. P., Raynaud, M., Ronce, N., Lemonnier, E., Calvas, P., Laudier, B., Chelly, J., Fryns, J. P., Ropers, H. H., Hamel, B. C., Andres, C., Barthélémy, C., Moraine, C., Briault, S. (2004): *Am. J. Hum. Genet.* 74: 552–557.
- [13] Talebizadeh, Z., Lam, D. Y., Theodoro, M. F., Bittel, D. C., Lushington, G. H., Butler, M. G. (2006): *J. Med. Genet.* 43: e21.
- [14] Blasi, F., Bacchelli, E., Pesaresi, G., Carone, S., Bailey, A. J., Maestrini, E., International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC) (2006): *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141: 220–221.
- [15] Gauthier, J., Bonnel, A., St-Onge, J., Karemra, L., Laurent, S., Mottron, L., Fombonne, E., Joobar, R., Rouleau, G. A. (2005): *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 132: 74–75.
- [16] Vincent, J. B., Kolozsvari, D., Roberts, W. S., Bolton, P. F., Gurling, H. M., Scherer, S. W. (2004): *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 129: 82–84.
- [17] Ylisaukko-oja, T., Rehnström, K., Auranen, M., Vanhala, R., Alen, R., Kempas, E., Ellonen, P., Turunen, J. A., Makkonen, I., Riikonen, R., Nieminen-von Wendt, T., von Wendt, L., Peltonen, L., Järvelä, I. (2005): *Eur. J. Hum. Genet.* 13: 1285–1292.
- [18] 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): *Nat. Genet.* 39: 25–27.
- [19] Autism Genome Project Consortium *et al.* (2007): *Nat. Genet.* 39: 319–328.
- [20] Sebat, J. *et al.* (2007): *Science* 316: 445–449.
- [21] Missler, M., Zhang, W., Rohmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R. E., Gottmann, K., Südhof, T. C. (2003): *Nature* 423: 939–948.
- [22] Kattenstroth, G., Tantalaki, E., Südhof, T. C., Gottmann, K., Missler, M. (2004): *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 2607–2612.
- [23] Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Südhof, T. C., Brose, N. (2006): *Neuron* 51: 741–754.
- [24] Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., Südhof, T. C. (2007): *Neuron* 54: 919–931.
- [25] Naisbitt, S. Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F., Sheng, M. (1999): *Neuron* 23: 569–582.
- [26] Sala, C., Piëch, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., Sheng, M. (2001): *Neuron* 31: 115–130.
- [27] Kreienkamp, H. J., Zitzer, H., Gundelfinger, E. D., Richter, D., Bockers, T. M. (2000): *J. Biol. Chem.* 275: 32387–32390.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Nils Brose
Abteilung Molekulare Neurobiologie
Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin
Hermann-Rein-Strasse 3
D-37075 Göttingen
Tel.: 0551-3899 725
Fax: 0551-3899 715
brose@em.mpg.de
www.em.mpg.de/site

AUTOR



Nils Brose

1981–1987 Studium der Biochemie, Biologie und Physiologie in Tübingen und Oxford, UK. 1987–1990 Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und am MPI für Psychiatrie in Martinsried. 1991–1995 Postdoc am Salk Institute in La Jolla, CA, USA, und am University of Texas Southwestern Medical Center in Dallas, TX, USA. 1995–2001 Leiter einer Forschergruppe am MPI für Experimentelle Medizin in Göttingen. Seit 2001 Direktor der Abteilung Molekulare Neurobiologie am MPI für Experimentelle Medizin in Göttingen. Seit 2002 Außerplanmäßiger Professor an der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen. Seit 2006 Honorarprofessor an der Biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen.