

Die Funktionen der Neureguline im Kortex und Muskel

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katharina Paulick

aus Berlin

2013

Diese Arbeit wurde im Zeitraum Juli 2009 – September 2013 am Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Gruppe Entwicklungsbiologie /Signaltransduktion in Nerven und Muskelzellen, unter der Leitung von Prof. Dr. Carmen Birchmeier angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier
2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am: 11. April 2014

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Carmen Birchmeier für ihre Betreuung, Unterstützung und Ratschläge, die diese Arbeit begleitet haben.

Thomas Müller danke ich für die Begleitung beider Projekte, für viele Tipps und Ideen. Vor allem möchte ich mich für die Korrektur dieser Dissertation bedanken.

Für exzellente technische Assistenz möchte ich mich bei Karin Gottschling, Petra Stallerow und Maria Braunschweig bedanken.

Dominique Bröhl, Cyril Cheret und Robin Schneider unterstützten diese Arbeit durch ausführliche wissenschaftliche Diskussionen.

Allen anderen Mitgliedern des Labors danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre auch außerhalb des Labors.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während der letzten Jahre.

Bei Fritz Rathjen bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Der Neuregulin-ErbB4-Signalweg	1
1.1.1 Die Neuregulin-Familie.....	1
1.1.2 Die Familie der ErbB-Rezeptoren	3
1.2 Funktionen des Neuregulin/ErbB-Signalwegs	5
1.2.1 Funktionen im Gehirn	5
1.2.2 Funktionen im Muskel.....	9
1.3 Zielstellung.....	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Material	13
2.1.1 Bakterienstämme	13
2.1.2 Plasmide	13
2.1.3 Antikörper	13
2.1.4 Mauslinien.....	14
2.1.5 Nährmedien	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren.....	16
2.2.2 Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren und Transformation kompetenter Bakterien.....	16
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	16
2.2.4 <i>In vitro</i> -Transkription.....	20
2.2.5 Histologische Methoden	21
2.2.6 In situ-Hybridisierung	23
2.2.7 Neuronale Zellkultur	24
2.3 Analyse und Quantifizierung	25
2.3.1 Quantifizierung der ErbB4+ Interneurone	25

2.3.2	Analyse der Fluoreszenzbilder von neuronalen Zellkulturen.....	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Die Identifizierung ErbB4-exprimierender Interneurone im Kortex	28
3.1.1	Kortikale GABAerge Interneurone exprimieren ErbB4	28
3.1.2	Nrg3-Expression in kortikalen Neuronen	31
3.1.3	Quantifizierung der Interneurone im Kortex <i>Nrg3</i> -mutanter Mäuse	32
3.2	Nrg1 und Nrg3 fördern die exzitatorische Synaptogenese in Interneuronen.....	41
3.2.1	Identifikation von ErbB4-positiven Interneuronen in Kultur	41
3.2.2	Lokalisation des Nrg3-Proteins	42
3.2.3	Nrg3 ko-lokalisiert mit exzitatorischen Synapsen.....	44
3.2.4	Exogenes Nrg1 fördert postsynaptisches PSD-95 in Interneuronen.....	46
3.2.5	Die Funktion von Nrg3 in der Genese exzitatorischer Synapsen	48
3.3	Untersuchung der ErbB3- und ErbB4-Funktion im Muskel	53
4	Diskussion	56
4.1	Die Funktion von Nrg3 in Migration und Differenzierung kortikaler Interneurone in vivo.....	56
4.1.1	Die Charakterisierung ErbB4-exprimierender Interneurone im Kortex.....	57
4.1.2	Nrg3 hat keinen Einfluss auf Anzahl und Differenzierung von ErbB4+ Interneuronen im Kortex und Hippocampus.....	60
4.2	Die Funktion von Nrg1, Nrg3 und ErbB4 in der Bildung glutamaterger Synapsen auf inhibitorischen Neuronen in vitro	61
4.2.1	Die subzelluläre Lokalisation von Nrg3 und ErbB4.....	62
4.2.2	Nrg1 und Nrg3 fördern die glutamaterge Synaptogenese auf Interneuronen.....	63
4.3	Die Funktion von ErbB3 und ErbB4 im Muskel.....	65
5	Zusammenfassung	67
5.1	Zusammenfassung Deutsch.....	67
5.2	Summary.....	68
	Literatur	69
	Anhang.....	82
a.	Einstellungen des LSM-Mikroskops für die Analyse synaptischer Proteine	82
b.	Beispiel-Pipeline zur Quantifizierung und Analyse synaptischer Proteine.....	82
	Erklärung.....	95

Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1	Die Familie der ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden, die Neureguline	2
Abbildung 1.2	Die Migration kortikaler Interneurone	8
Abbildung 1.3	Aufbau einer Muskelspindel	10
Abbildung 2.1	Automatische Bildanalyse synaptischer Proteine von Neuronenkulturen	26
Abbildung 3.1	ErbB4 wird in postmitotischen Zellen der medialen ganglionischen Eminenz exprimiert	29
Abbildung 3.2	ErbB4 markiert GABAerge Interneurone im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex	30
Abbildung 3.3	Nrg3 mRNA ist in kortikalen Neuronen, auch in GABAergen Interneuronen lokalisiert	31
Abbildung 3.4	Die Anzahl der ErbB4+ Interneurone im Kortex adulter <i>Nrg3</i> ^{-/-} mutanter Mäuse ist nicht verändert	33
Abbildung 3.5	Die Identität der ErbB4+ Interneurone im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex von <i>Nrg3</i> ^{-/-} Mäusen ist unverändert	35
Abbildung 3.6	Die Sst+ und Cr+ Interneurone bilden einen geringen Anteil an der ErbB4-Population im präfrontalen Kortex und im primären somatosensorischen Kortex	36
Abbildung 3.7	Die Cb+ und ErbB4+ Interneuronenpopulationen überlappen im präfrontalen Kortex stärker als im primären somatosensorischen Kortex	37
Abbildung 3.8	Die Dichte der ErbB4+ Interneurone im Hippocampus von <i>Nrg3</i> ^{-/-} Mäusen ist weitgehend unverändert	39
Abbildung 3.9	ErbB4+ Interneurone können in Kultur durch Ko-Expression von <i>GAD67</i> , Größe und Form identifiziert werden	41
Abbildung 3.10	Nrg3 ist auf Dendriten von ErbB4+ Interneuronen lokalisiert	43
Abbildung 3.11	Nrg3 ko-lokalisiert mit ErbB4 und exzitatorischen Synapsen auf Interneuronen	45
Abbildung 3.12	Nrg1 erhöht die Anzahl der PSD-95+ Puncta in Interneuronen ErbB4-abhängig	47
Abbildung 3.13	Die Anzahl, Fläche und Intensität von PSD-95+ Puncta auf ErbB4+ Interneuronen ist in <i>Nrg3</i> ^{-/-} Kulturen reduziert	49
Abbildung 3.14	Glutamaterge Synapsen auf ErbB4+ Interneuronen von <i>Nrg3</i> ^{-/-} Mäusen enthalten weniger PSD-95	51
Abbildung 3.15	Nrg3-enthaltendes Medium fördert PSD-95-Puncta auf kortikalen ErbB4+ Interneuronen	52

Abbildung 3.16	ErbB3, aber nicht ErbB4, ist essentiell für die Entwicklung von Muskelspindeln	54
Abbildung 3.17	Die sensorische Muskelinnervierung von <i>Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}</i> Mäusen im Muskel	55
Tabelle 2.1	Antikörper	13
Tabelle 2.2	Parameter zur automatischen Identifizierung von synaptischen Strukturen	27

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ
+	positiv
3x	Zelldichte 3x 10 ⁴ Zellen pro 1,9cm ² Well
Abb	Abbildung
BACE1	Beta-Sekretase1
bp	Basenpaar
BSA	engl. „bovine serum albumin“, Rinderserum
CA	Cornu Ammonis, Ammonshorn
Cb	Calbindin
CCK	Cholecystokinin
Cr	Calretinin
CRD	engl. „cystein-rich domain“
Cre	Cre-Rekombinase aus dem P1 Bakteriophagen
DAPI	engl. „4',6-Diamidin-2-phenylindol“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DIV	engl. „days in vitro“
DMEM	engl. „Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. „epidermal growth factor“
engl.	englisch
ErbB	engl. „Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene“
ES Zellen	embryonale Stammzellen
g	Gramm
GABA	engl. „gamma-Aminobutyric acid“
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HS	engl. „Horse serum“ Pferdeserum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig-like	engl. „Immunglobulin-like“
l	Liter
loxP	engl. „Locus of Crossover in P1“
M	Molar
MDC	Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch
merge	(engl.) verschmelzen
MGE	mediale ganglionische Eminenz
MHC	engl. „myosin heavy chain“
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNS	„messenger“ Ribonukleinsäure

MW	Molekulargewicht
Neo	Neomycin
Nkx2.1	„NK2 homeobox 1“
nNos	engl. „neuronal nitric oxide synthase“
Nrg	Neuregulin
NTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
P1	postnataler Tag 1
POA	engl. „preoptic area“
POD	Peroxidase
PBS	engl. „Phosphate buffered saline“
PBX	PBS mit 0.1% Triton X-100
PCR	engl. „Polymerase chain reaction“
PFA	Paraformaldehyd
PFK	präfrontaler Kortex
PSD-95	engl. „post synaptic density protein 95“
PV	Parvalbumin
RNS	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
S1	primärer somatosensorischer Kortex
SEM	Standardfehler
Sema	Semaphorin
Sst	Somatostatin
TA-Muskel	Muskel Tibialis anterior
TK	Tyrosinkinase-Domäne
TM	Transmembrandomäne
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
u.a.	unter anderem
vGlut1	engl. „vesicular glutamate transporter 1“
wt	Wildtyp
μM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Der Neuregulin-ErbB4-Signalweg

1.1.1 Die Neuregulin-Familie

Die Neureguline gehören zu einer Familie der EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren („epidermal growth factor“). Bisher wurden vier Neuregulin Gene, *Nrg1-4*, identifiziert (Falls, 2003; Hayes und Gullick, 2008). Die membranständigen Proteine bestehen aus einer zytoplasmatischen Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer extrazellulären Domäne, die die EGF-Domäne enthält und in einigen Isoformen durch proteolytisches Spalten freigesetzt werden kann (Abb. 1.1; Massague und Pandiella, 1993). Sie wirken als Liganden der Tyrosinkinase-Rezeptoren der ErbB-Familie (S. Burden und Yarden, 1997; Dougall et al., 1994; Hynes und Stern, 1994; Plowman et al., 1993; Qian et al., 1994). Verschiedene Funktionen wurden in der Maus für *Nrg1* und seine Rezeptoren ErbB3, ErbB4 und den Ko-Rezeptor ErbB2 beschrieben (Brinkmann et al., 2008; Buonanno und Fischbach, 2001; Burden und Yarden, 1997; Falls, 2003; Meyer und Birchmeier, 1995). Über die biologische Funktion der Neureguline 2-4 ist wenig bekannt. Die Aktivierung von ErbB Rezeptoren durch Neureguline regelt die Migration und Proliferation sowie die Stratifikation und Adhäsion von Zellen in der kortikalen Entwicklung (Falls, 2003; Hayes und Gullick, 2008; Veikkolainen et al., 2012).

1.1.1.1 Neuregulin1

Das *Nrg1* Gen kodiert mindestens 12 verschiedene Protein-Isoformen durch die Verwendung verschiedener Promotoren und alternativem Spleißen (Buonanno und Fischbach, 2001; Falls, 2003). *Nrg1* Typ I und II besitzen eine immunglobulinähnliche extrazelluläre Domäne (Ig-*Nrg1*), die durch Proteolyse abgetrennt werden kann (Abb. 1.1A). Die *Nrg1* Typ III Isoformen enthalten eine N-terminale cysteinreiche Domäne (CRD-*Nrg1*), in die eine zweite Transmembrandomäne eingebettet ist. Wenn diese Isoform C-terminal der EGF Domäne gespalten wird, bleibt die Ectodomäne membrangebunden. Die Sequenz der EGF-Domäne dieser drei Isoformen ist sehr ähnlich und induziert die Aktivierung der Tyrosinkinasen der ErbB-Familie.

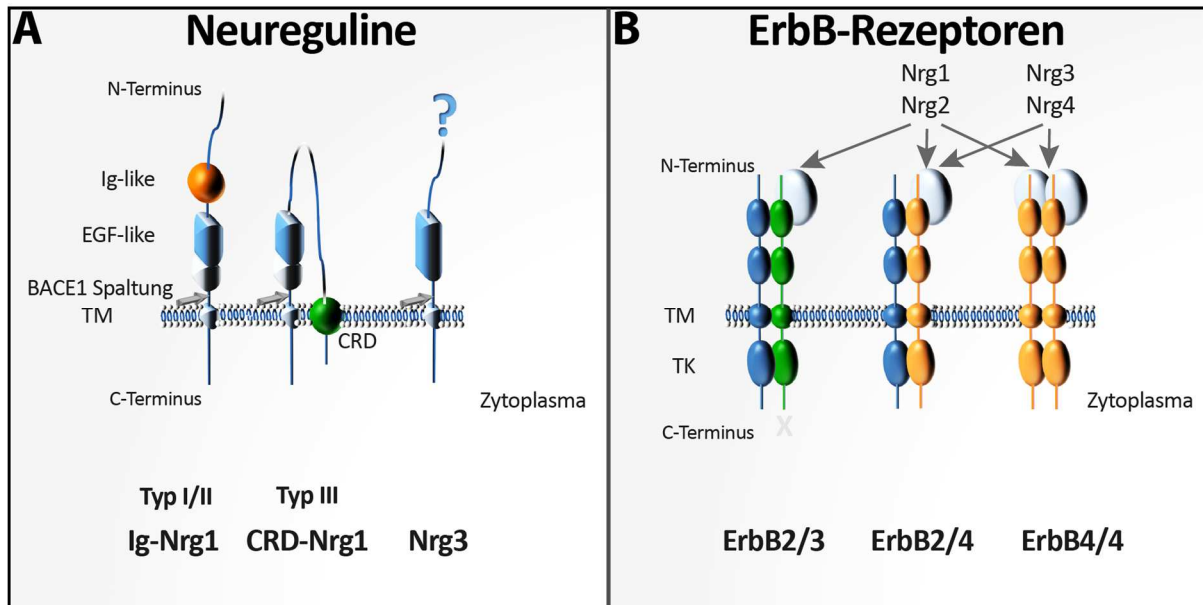


Abbildung 1.1 Die Familie der ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden, die Neureguline

Die EGF-ähnlichen (EGF-like) Domänen der Neureguline binden und aktivieren ErbB-Rezeptoren. Während die Nrg1-Isoformen Liganden für ErbB3 und ErbB4 sind, kann Nrg3 nur von ErbB4 gebunden werden. Für ErbB2 wurde noch kein Ligand identifiziert. **A)** Nrg1 Typ I und II (Ig-Nrg1) besitzen eine immunglobulinähnliche extrazelluläre Domäne, die durch die Protease BACE1 abgetrennt werden kann. Die Nrg1 Typ III Isoformen (CRD-Nrg1) enthalten eine N-terminale cysteinreiche Domäne, die nach C-terminaler Spaltung der Ectodomäne membrangebunden bleibt. Die extrazelluläre Domäne von Nrg3 enthält eine EGF-Domäne und kann proteolytisch gespalten werden. Es gibt verschiedene Splicevarianten für Nrg3, die sich durch ihre N-Terminale Domäne unterscheiden. **B)** ErbB-Rezeptoren enthalten eine Liganden bindende extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne (TM) und eine zytoplasmatische Tyrosinkinase Domäne (TK). Die Tyrosinkinase von ErbB3 ist nicht biologisch aktiv. ErbB2 ist bevorzugter Heterodimer-Partner für ErbB3 (ErbB2/3) und ErbB4 (ErbB2/4). ErbB4 ist auch als Homodimer (ErbB4/4) aktiv. (EGF: Epidermal growth factor; TM: Transmembrandomäne, Ig: Immunglobulin; CRD: Cysteinreiche Transmembrandomäne, Nrg: Neuregulin; nach Buonanno und Fischbach, 2001; Kao et al., 2010)

Nrg1 besitzt verschiedene essentielle Funktionen in der Entwicklung (Brinkmann et al., 2008; Britsch et al., 1998; Burden und Yarden, 1997; Chen et al., 2010; Falls, 2003; Fisahn et al., 2009; Grossmann et al., 2009; Krivosheya et al., 2008; Li et al., 2007; Meyer und Birchmeier, 1995; Tan et al., 2011). *Nrg1*, das von propriozeptiven Neuronen produziert wird, kontrolliert die Induktion der Muskelspindel, einem propriozeptiven Organ, das die Muskelspannung misst (Cheret et al., 2013; Hippenmeyer et al., 2002; Leu et al., 2003; Maier, 1997). Das Wachstum, Überleben und die Regeneration von Herzmuskelzellen sind

ebenfalls *Nrg1*-abhängig (Crone et al., 2002; Garratt, 2006; Ozcelik et al., 2002; Rohrbach et al., 1999; Zhao et al., 1998).

1.1.1.2 Neuregulin3

Nrg3 wird durch das *Nrg3* Gen kodiert und vom Embryonalstadium Tag 13 (E13.5) bis ins adulte Stadium im Zentralnervensystem exprimiert (Zhang et al., 1997). Die Sequenz der EGF-Domäne und der Transmembrandomäne hat eine hohe Ähnlichkeit mit anderen Wachstumsfaktoren der Neuregulin-Familie (Zhang et al., 1997). Die extrazelluläre EGF-Domäne kann abgespalten werden und den ErbB4-Rezeptor aktivieren (Zhang et al., 1997). ErbB2/ErbB4 Heterodimere und ErbB4 Homodimere können den Liganden *Nrg3* binden, aber nicht ErbB2 oder ErbB3 (Abb. 1.1B, Zhang et al., 1997).

Die Identität der *Nrg3*-exprimierenden Zellen ist noch nicht vollständig verstanden. Während der Embryonalentwicklung konnte durch radioaktive *in situ*-Hybridisierung eine prominente *Nrg3* Expression der ganzen medialen ganglionischen Eminenz beobachtet werden (Zhang et al., 1997). Ein weniger ausgebreitetes Signal für *Nrg3* mRNA ("messenger" Ribonucleinsäure) in der medialen ganglionischen Eminenz wurde von Li und Kollegen beobachtet (H. Li et al., 2012). Zhang und Kollegen zeigten zusätzlich ein starkes *Nrg3* Signal im zerebralen Kortex, im Hippocampus und im Thalamus (Zhang et al., 1997). *Nrg3* mRNA wurde auch in Astrozyten des Hypothalamus nachgewiesen, aber Cahoy und Kollegen beobachteten anhand einer Kombination aus Zellsortierung („fluorescent activated cell sorting“, FACS) und GenChips, dass *Nrg3* mRNA vorwiegend in Nervenzellen und nicht in Astrozyten exprimiert wird (Cahoy et al., 2008; Y. J. Ma et al., 1999).

1.1.2 Die Familie der ErbB-Rezeptoren

Die Mitglieder der ErbB-Familie sind Rezeptoren für Wachstumsfaktoren der EGF Familie. Sie umfasst EGFR und ErbB2-4 (Bargmann et al., 1986; Coussens et al., 1985; Kraus et al., 1989; Plowman et al., 1993; Ullrich et al., 1984). ErbB-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Proteinkinasedomäne am C-Terminus (Abb. 1.1B). ErbB3 und ErbB4 können Liganden binden und ErbB2 scheint nur als Ko-Rezeptor zu agieren, da bisher kein Ligand für ErbB2 identifiziert werden konnte. Zusätzlich besitzen die Rezeptoren ErbB2 und ErbB4 eine aktive Tyrosinkinasedomäne, während diese im ErbB3-Rezeptor katalytisch inaktiv ist. ErbB2 ist

bevorzugter Heterodimer-Partner für ErbB3 und ErbB4 (Graus-Porta et al., 1997). Die Tyrosinkinasedomäne wird durch extrazelluläre Liganden-Bindung und Rezeptor-Dimerisierung aktiviert (Yarden und Schlessinger, 1987). Der Autophosphorylierung der Tyrosinreste im C-terminalen Bereich folgt die Rekrutierung von Molekülen, die das Signal ins Zellinnere weiterleiten (Oda et al., 2005).

Überexpression von ErbB-Rezeptoren wird in Tumoren beobachtet und Inhibitoren der Kinaseaktivität oder Antikörper, die gegen die Rezeptoren gerichtet sind, werden bereits für Therapien angewendet (Olayioye, 2001).

1.1.2.1 Der ErbB3-Rezeptor

1989 wurde der ERBB3-Rezeptor isoliert und charakterisiert, der zu über 80% strukturelle Ähnlichkeit mit EGFR und ERBB2 aufweist (Kraus et al., 1989). Das ErbB3 Homodimer ist katalytisch inaktiv; im ErbB2/ErbB3-Heterodimer bindet der ErbB3 Rezeptor den Liganden, während der ErbB2 Rezeptor die katalytische Aktivität beiträgt (X. Chen et al., 1996; Holbro et al., 2003; Olayioye et al., 2000; Yarden und Sliwkowski, 2001). ErbB3 mRNA ist in der frühen Embryogenese der Maus in Neuralleistenzellen, Schwann'schen Zellen und in Somiten nachweisbar (Birchmeier, 2009; Buac et al., 2008). Homozygote Mausmutanten für *ErbB3* sterben embryonal und besitzen keine Schwann'schen Zellen, und in der Folge sterben motorische und sensorische Neurone ab (Erickson et al., 1997; Riethmacher et al., 1997). ErbB3 wird in Prostata-, Blasen- und Brustkrebs überexprimiert (Alimandi et al., 1995; Culouscou et al., 1993; Lee und Maihle, 1998; Shintani et al., 1995a; Shintani et al., 1995b).

1.1.2.2 Der ErbB4-Rezeptor

Plowman und Kollegen isolierten 1993 den ERBB4 Rezeptor, dessen Tyrosinkinasedomäne zu 77% mit der von ERBB2 identisch ist (Plowman et al., 1993). Verschiedene ErbB4-Isoformen wurden beobachtet, die durch alternatives Spleißen entstehen und sich in den zytoplasmatischen und extrazellulären Domänen unterscheiden (Gilmour et al., 2001). Während der Embryogenese der Maus wird ErbB4 im Vorderhirn, Skelettmuskel, im Herzmuskel und der Lungenanlage exprimiert (Plowman et al., 1993; Yarden und Sliwkowski, 2001). Der Herzmuskel von Mäusen, denen der ErbB4-Rezeptor fehlt, ist fehlentwickelt, und die Mäuse sind embryonal letal (Gassmann et al., 1995). Diese Letalität

wurde durch Expression von ErbB4 unter der Kontrolle des *MHC*-Lokus („myosin heavy chain“) umgangen (Tidcombe et al., 2003). Diese „heart-rescued“ *ErbB4*^{-/-} Mauslinie ist Subjekt weiterer Studien und wird in dieser Arbeit als *ErbB4*^{-/-} Mauslinie bezeichnet.

1.2 Funktionen des Neuregulin/ErbB-Signalwegs

1.2.1 Funktionen im Gehirn

1.2.1.1 Die klinische Bedeutung des Neuregulin/ErbB4-Signalwegs

Wird die Balance der zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Nervenzellen bestehenden Verschaltung gestört, können neurologische Störungen die Folge sein. Erkrankungen wie Schizophrenie, Autismus und Epilepsie zeichnen sich durch Fehlfunktion des kortikalen Netzwerkes aus und teilen sowohl phänotypische Merkmale also auch genetische Ursachen.

Schizophrenie (griech.: gespaltener Geist) ist eine schwere psychische Erkrankung, die sich u.a. durch Störung des Denkens und der Affektivität auszeichnet. Patienten mit Epilepsie (griech.: der Anfall) leiden unter unwillkürlichen Bewegungen und Krämpfen. Autismus (griech.: selbst) ist eine Entwicklungsstörung mit verstärktem Sinneseindruck und abgeschwächter sozialer Interaktion. Diese Erkrankungen teilen Anzeichen wie die Störung des Bewusstseins, der Wahrnehmung sowie Depressionen und sind mit hohen Anteilen genetisch bedingt. Studien zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit eines eineiigen Zwillings, ebenfalls an Schizophrenie zu erkranken, 45% beträgt (Picchioni und Murray, 2007). Bei Autismus ist dieser genetische Faktor mit 95,7% wesentlich höher (Happé et al., 2006; Wang et al., 2009). Die Prozentzahl von eineiigen Zwillingen, die beide an einer bipolaren Störung leiden, beträgt 60% (Wang et al., 2009). Die Zwillingsstudien ergaben eine Rate von 70% für Epilepsie (Helbig et al., 2008; Kjeldsen et al., 2003). Es konnten bereits verschiedene Gene identifiziert werden, deren Mutation zu unterschiedlichen Arten von Epilepsie führt (Hildebrand et al., 2013).

Um Risikogene für Schizophrenie zu identifizieren, wurden Assoziationsstudien von Familien mit Patienten durchgeführt. Viele dieser Gene werden entweder in Interneuronen exprimiert oder ihre Signalwege sind eng mit ihnen verknüpft (Harrison und Weinberger, 2005). Während Pyramidenzellen Informationen zwischen verschiedenen kortikalen

Bereichen sowie zu anderen Bereichen des Gehirns übertragen, haben Interneurone die Funktion, sich in einer Region zu verschalten und Pyramidenzellen zu inhibieren (Klausberger und Somogyi, 2008). Die Fehlfunktion von GABAergen Interneuronen führt folglich zur Überreizung des Kortex (Chao et al., 2010). Immer mehr Studien belegen, dass Interneurone die Ursache für eine gestörte Reizleitung in Krankheiten wie Schizophrenie und Autismus sein können (Galanopoulou, 2012; Markram et al., 2004; Simpson et al., 2010). Die Catechol-O-methyltransferase (COMT) wurde 2002 von Shifman und Kollegen in einer Studie als Risikofaktor für Schizophrenie identifiziert (Shifman et al., 2002). Die Verteilung der COMT und ihre Funktion, Dopamin abzubauen, lässt auf eine Rolle im Signalweg für dopaminerge Interneurone schließen (Axelrod und Tomchick, 1958).

Die Funktion von Nrg1-Signalen im Gehirn wurde durch die Analyse von Patienten, konditionellen Mutationen in Mäusen und Studien der Wirkung von exogen appliziertem Nrg1 untersucht. Steffansson und Kollegen haben 2002 fünf Polymorphismen und zwei Mikrosatelliten im NRG1 Genlokus aufgezeigt, deren Vorhandensein mit Schizophrenie-Suszeptibilität korrelieren (Stefansson et al., 2003; Stefansson et al., 2002). Zusätzlich wurden in einer Studie von Pei-Lung Chen drei Polymorphismen im ersten Intron des NRG1 Gens mit Schizophrenie assoziiert (P. L. Chen et al., 2009). Die Mutation des *Nrg1*-Gens wurde im Mausmodell getestet (Allen et al., 2008; Harrison und Law, 2006; Harrison und Weinberger, 2005; Law et al., 2006). *Nrg1*-heterozygote Tiere zeigten eine abweichende Reaktion auf einen Schreckreiz (Präpulsinhibition) und verhielten sich hyperaktiv, wenn sie einer neuen Umgebung ausgesetzt waren (Stefansson et al., 2002). Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Analyse von Mäusen beobachtet, die nur ein funktionelles *ErbB4*-Allel trugen (Stefansson et al., 2002).

Mutationen im NRG1 Lokus wurden außerdem mit Wahrnehmungsstörungen, fehlerhafter neurologischer Entwicklung und Autismus in Zusammenhang gebracht (Balciuniene et al., 2007; Fallin et al., 2003; Faraone et al., 2006). Eine Studie von Tan und Kollegen zeigte 2011, dass sich die Konzentrationen von Nrg1 Protein und mRNA im Kortex von Ratten erhöhen, wenn sie chemisch durch Pilocarpin und elektrisch durch „Kindling“ induzierte epileptische Anfälle erleiden (Tan et al., 2011). Die Injektion von Nrg1 reduziert die Zeit der Anfälle und erhöht die Anzahl der benötigten Kindling-Reize (Tan et al., 2011). Die Expression verschiedener Nrg1-Isoformen ist in Patienten, die unter Schizophrenie leiden, verändert (Bertram et al., 2007; Hashimoto et al., 2004; Weickert et al., 2012). Dabei gibt es Studien,

die eine Reduktion des Proteins und andere, die eine Anreicherung von sowohl Protein und auch mRNA von *Nrg1* als Risikofaktoren identifizierten (Bertram et al., 2007; Hashimoto et al., 2004; Weickert et al., 2012). In Mausexperimenten wurde zusätzlich deutlich, dass verschiedene *Nrg1*-Isoformen die synaptische Plastizität beeinflussen können (Deakin et al., 2012; Stefansson et al., 2002).

Auch im ersten Intron des *Nrg3* Locus von Patienten, die an Schizophrenie oder Wahnvorstellungen litten, wurden Einzelnucleotid Polymorphismen identifiziert (Benzel et al., 2007; P. L. Chen et al., 2009).

1.2.1.2 Die Entwicklung kortikaler Interneurone

Interneurone, die den Neurotransmitter GABA („gamma-Aminobutyric acid“) exprimieren, entstehen vorwiegend in den ganglionischen Eminenzen und migrieren tangential zum Kortex (Abb. 1.2; Anderson et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Marin und Rubenstein, 2003; Nery et al., 2002; Pleasure et al., 2000; Wichterle et al., 2001; Yozu et al., 2005). Sie vermeiden dabei zum Großteil das Striatum und passieren die subventrikuläre Schicht, die *Nrg1*-CRD exprimiert (Abb. 1.2; Flames et al., 2004). Das im Kortex befindliche *Nrg1*-Ig kann chemoattraktiv auf ErbB4-positive Interneurone wirken (Abb. 1.2; Flames et al., 2004). Während der Embryogenese werden *Nrg1* und *Nrg3*, aber nicht *Nrg2*, im Kortex exprimiert (Falls, 2003). Der ErbB4-Rezeptor erscheint in nahezu allen migrierenden Interneuronen (Fox und Kornblum, 2005; Yau et al., 2003). ErbB4-exprimierende Neurone markieren etwa dreiviertel der GABAergen Interneuronenpopulation im adulten Vorderhirn der Maus (Fazzari et al., 2010; Fox und Kornblum, 2005; Neddens und Buonanno, 2010).

Die Mutation von *ErbB4* führt zu einer Reduktion der Interneurone des Kortex und Hippocampus (Buonanno und Fischbach, 2001; Flames et al., 2004). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass Interneurone der *ErbB4*^{-/-} Mauslinie eine defekte Migration aufweisen (Flames et al., 2004).

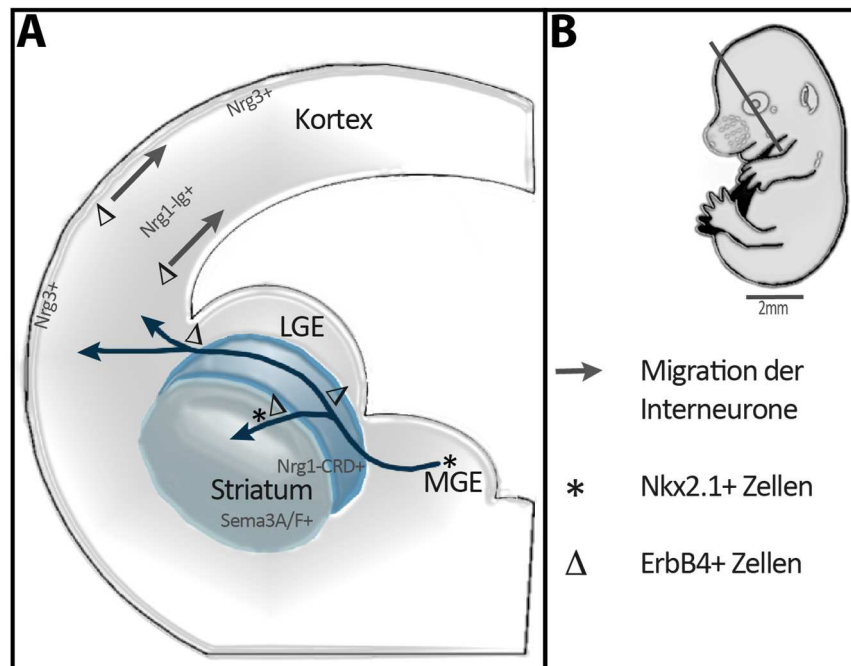


Abbildung 1.2 Die Migration kortikaler Interneurone

Der Großteil kortikaler Interneurone entsteht in der medialen ganglionischen Eminenz. **A)** Schematische Darstellung der coronalen Ebene des Vorderhirns eines E14.5 Embryos. Die tangentielle Migration der Interneurone wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst und beginnt in der subventrikulären Zone. Die Zellen migrieren entlang des Striatums zum Kortex, dort bewegen sie sich verstärkt sowohl entlang der kortikalen Platte als auch in den tiefer gelegenen subventrikulären Schichten. Die Vorläuferzellen der medialen ganglionischen Eminenz exprimieren Nkx2.1. Während Interneurone, die zum Kortex migrieren, die Nkx2.1-Expression abschalten, bilden Nkx2.1-positive Zellen die Interneuronenpopulation des Striatums. Die Sema3A- und Sema3F-Expression im Bereich des Striatums verhindert das Einwandern der Nkx2.1-negativen Interneurone. Sowohl Interneurone des Kortex als auch des Striatums exprimieren ErbB4. Nrg3 wird während der Kortikogenese zunächst ventral im Großhirn und ab E14.5 in höheren kortikalen Schichten exprimiert. **B)** Schematische Darstellung der Schnittebene von (A), Legende für (A). (Nrg: Neuregulin, LGE/MGE: laterale/mediale ganglionische Eminenz; Zusammenfassung von: Fazzari, 2009; Flames et al., 2004; Huang, 2009; Li et al., 2012; Kaufmann, 1992; Yau et al., 2003)

1.2.1.3 Die Bedeutung des Neuregulin-ErbB4-Signalwegs in der Synaptogenese

In Mausexperimenten wurde beobachtet, dass eine Störung der Nrg1/ErbB4-Signale im Gehirn eine Reduktion von exzitatorischen Puncta auf kortikalen Interneuronen zur Folge hat (Buonanno und Fischbach, 2001; Fazzari et al., 2010; Krivosheya et al., 2008; Ting et al., 2011). Es wurde in verschiedenen Studien sowohl die Funktion von Nrg1 als exogen zugesetztes Protein als auch die Signalleitung über den ErbB4-Rezeptor analysiert (Fazzari et

al., 2010; Krivosheya et al., 2008; Ting et al., 2011; Wen et al., 2010). ErbB4 ist sowohl an exzitatorischen als auch inhibitorischen Synapsen der Interneurone lokalisiert und seine Überexpression kann die Intensität des präsynaptischen Proteins Synapsin erhöhen (Krivosheya et al., 2008). Ting und Kollegen beobachteten in vitro, dass exogen zugesetztes Nrg1 die Anzahl und Größe von postsynaptischen exzitatorischen Punkten erhöhen kann (Ting et al., 2011). Die Ectodomäne von ErbB4 ist zur Nrg1-Signalleitung essentiell und exogen zugegebenes ErbB4 kann den Effekt von Nrg1 in kultivierten Neuronen verhindern (Krivosheya et al., 2008; Ting et al., 2011). Fazzari und Kollegen stellten eine Reduktion von vGlut1+ Puncta auf GABAergen Dendriten in *ErbB4*^{-/-} Interneuronen in vivo fest (Fazzari et al., 2010). Vor allem die glutamaterge Innervation von Interneuronen wird somit entscheidend von Nrg1/ErbB4-Signalen beeinflusst (Y. J. Chen et al., 2010; Fazzari et al., 2010; Ting et al., 2011). Sowohl Nrg1, Nrg3 als auch ErbB4 werden während der Embryogenese der Maus im Vorderhirn exprimiert (Liu et al., 2013; Yau et al., 2003; Zhang et al., 1997). Für Nrg3 wurde bisher keine Funktion in der Synaptogenese untersucht.

1.2.2 Funktionen im Muskel

1.2.2.1 Die Bildung von Muskelspindeln

Die Muskelfasern des Skelettmuskelgewebes bestehen aus extrafusalen Fasern, deren Kontraktion der Bewegung dient, sie werden von alpha-Motorneuronen innerviert. Intrafusale Muskelfasern werden von propriozeptiven sensorischen Neuronen und gamma-Motorneuronen innerviert. Propriozeptive sensorische Neurone detektieren die Muskelstreckung sowie die Position der Gliedmaßen und geben diese Informationen über afferente Bahnen ans Zentrale Nervensystem weiter (Abb. 1.3). Die intrafusalen Muskelfasern, die parallel zu extrafusalen Fasern angeordnet sind, bilden zusammen mit den Nervenenden und einer Kapsel die Muskelspindel (Abb. 1.3).

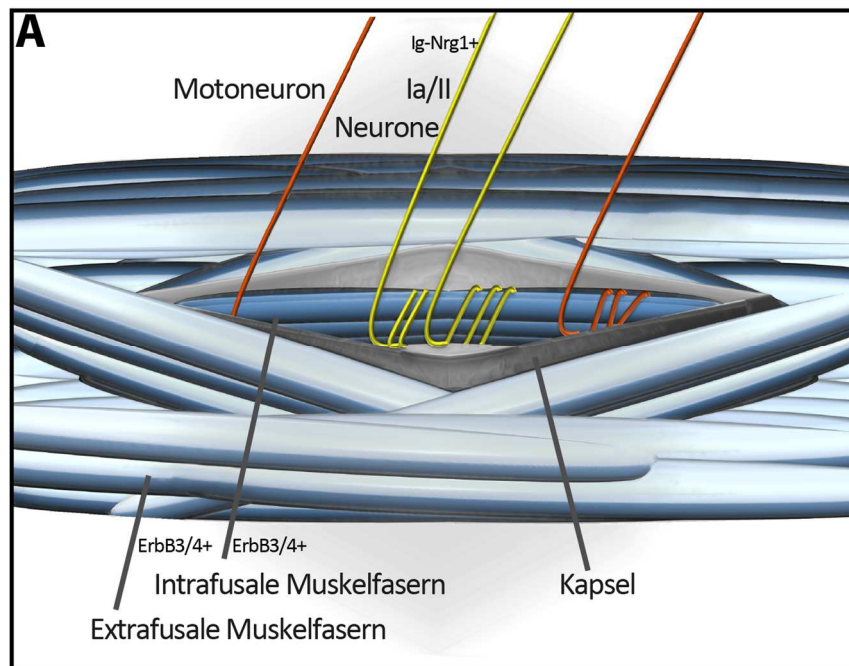


Abbildung 1.3 Aufbau einer Muskelspindel

Muskelspindeln bestehen aus intrafusalen und extrafusalen Muskelfasern, die von einer Kapsel umgeben sind. Sie werden von sensorischen und Motoneuronen innerviert. **A)** Die intrafusalen Muskelfasern der Muskelspindel werden an ihren kontraktile Enden von gamma-Motorneuronen innerviert. Durch die Spannung der Enden der intrafusalen Muskelfasern wird ihre Mitte gedehnt und erzeugt Aktionspotentiale in den sensorischen Nervenfasern (Ia/II-Fasern), die das Signal zum Rückenmark weiterleiten. Sowohl extra- als auch intrafusale Muskelfasern exprimieren ErbB3 und ErbB4 und sind von einer Kapsel umgeben, die in extrafusale Muskelfasern eingebettet ist. Die sensorischen Nerven exprimieren Ig-Nrg1. (Zusammenfassung von Hippenmeyer et al., 2002; Klink et al., 2005)

Der Prozess der Muskelspindelbildung ist noch nicht vollständig verstanden. Die Differenzierung intrafusaler Muskelfasern geht mit der Innervierung eines sensorischen Nervs (Ia affrente Faser) im Muskel einher (Maier, 1997; Walro und Kucera, 1999). Mutationen, die zum Fehlen des afferenten Nervs führen, verhindern die Differenzierung von Spindeln (Ernfors et al., 1994; Farinas et al., 1994; Klein, 1994; Tessarollo et al., 1994). Diese Studien und weitere legen nahe, dass der Kontakt des afferenten Nervs mit den Muskelfasern die Muskelspindelbildung initiiert. In der folgenden Entwicklung umschlingt der Nerv die Muskelfasern und diese Einheit wird von einer Kapsel umschlossen. In der Maus ist die Induktion von Muskelspindeln nach der Embryogenese abgeschlossen, die Muskelspindel matriert aber in der postnatalen Phase weiter (Cheret et al., 2013; Hippenmeyer et al., 2002).

Während die Expression von Ig-Nrg1 hauptsächlich in propriozeptiven Nervenfasern nachweisbar ist, wird CRD-Nrg1 in allen sensorischen Nerven und in Motorneuronen gebildet (Hippenmeyer et al., 2002). Die Differenzierung von Muskelspindeln wird durch den Kontakt von Nrg1-exprimierenden sensorischen Nerven mit Muskelfasern initiiert (Hippenmeyer et al., 2002; Leu et al., 2003). In konditionellen Mutanten für Nrg1 wurde gezeigt, dass nur der Verlust von Ig-Nrg1, aber nicht von CRD-Nrg1, in den innervierenden Neuronen zum Verlust von Muskelspindeln und defektem Verzweigen dieser sensorischen Nervenenden im Muskel führt (Cheret et al., 2013; Hippenmeyer et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird CRD-Nrg1, aber nicht Ig-Nrg1, für die Entwicklung von Schwann'schen Zellen und für die Myelinisierung benötigt (Brinkmann et al., 2008; Grossmann et al., 2009; Meyer et al., 1997; Michailov et al., 2004). ErbB2-4 werden während der Embryogenese in Muskelfasern exprimiert. In muskelspezifischen Mutanten für ErbB2 findet der Kontakt von afferenten Nerven mit den Fasern statt, jedoch werden keine Muskelspindeln gebildet (Andrechek et al., 2002; Leu et al., 2003). Sowohl Nrg1 in sensorischen Nerven als auch ErbB2 im Muskelgewebe sind für die Differenzierung von Muskelspindeln essentiell (Andrechek et al., 2002; Hippenmeyer et al., 2002; Leu et al., 2003). Mögliche Funktionen von ErbB3 und ErbB4 in der Bildung der Muskelspindel wurden noch nicht näher untersucht.

1.3 Zielstellung

In dieser Arbeit wurde im Wesentlichen die Funktion von Nrg3 auf ErbB4-exprimierende Interneurone untersucht. Außerdem sollte der verantwortliche Rezeptor für den Nrg1-Signalweg während der Induktion der Muskelspindel bestimmt werden.

Der ErbB4-Rezeptor wird in dem Großteil migrierender Interneurone exprimiert und seine Abwesenheit führt zur Reduktion vorwiegend Parvalbumin(PV)-exprimierender Interneurone im Kortex (Buonanno und Fischbach, 2001; Fazzari et al., 2010; Flames et al., 2004; Fox und Kornblum, 2005; Yau et al., 2003). Zusätzlich beeinflusst ErbB4 in vivo und in vitro die glutamaterge Reizleitung im Kortex (Fazzari et al., 2010; Ting et al., 2011). Die Identität der ErbB4-exprimierenden Interneurone wurde im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex bisher nicht ausführlich charakterisiert. Nrg3 wird während der Embryogenese bis ins adulte Stadium in beiden Regionen stark exprimiert, aber seine Funktion bisher nicht untersucht. Dr. Thomas Müller erzeugte einen *Nrg3*-mutanten

Mausstamm. *Nrg3*-Mutanten sind lebensfähig und fruchtbar. Verhaltenstests zeigen, dass sie hyperaktiv im „Open Field Test“ sind und eine erhöhte Impulsivitäts-Kontrolle aufweisen (nicht publizierte Daten aus dem Labor von August Smit, Amsterdam). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Population der kortikalen ErbB4-positiven Interneurone in *Nrg3*-mutanten Mäusen beeinträchtigt ist. Dazu untersuchte ich, in welchen Interneuronenpopulationen ErbB4 in adulten Tieren exprimiert wird. In *Nrg3*^{-/-} Mäusen konnte ich keine Reduktion der ErbB4-Population im präfrontalen und somatosensorischen Kortex beobachten.

In Zellkulturexperimenten sollte überprüft werden, ob *Nrg3* Einfluss auf die exzitatorische Synaptogenese auf Interneurone hat. Dazu etablierte ich neuronale Zellkulturen sehr geringer Dichte und validierte die bereits an Wildtyp Neuronen getestete Wirkung von *Nrg1* zusätzlich auf *ErbB4*-mutanten Neuronen (Ting et al., 2011). Ich konnte feststellen, dass *ErbB4*-mutante Interneurone weniger PSD-95-positive Puncta aufwiesen und ihre Anzahl nicht durch die Zugabe von exogenem *Nrg1* erhöht werden konnte, aber in *ErbB4*-heterozygoten Zellen.

Ich analysierte außerdem die Expression von *Nrg3* in Zellkulturen und konnte eine hohe Ko-Lokalisation der *Nrg3*-EGF-Domäne und ErbB4 auf Interneuronen feststellen. Im Folgenden überprüfte ich, ob die glutamaterge Innervation der ErbB4-exprimierenden Interneurone in *Nrg3*-mutanten Zellkulturen beeinträchtigt war und ob die Kultivierung in konditioniertem Medium von *Nrg3*-mutanten oder Kontrollzellen die Anzahl der PSD-95-Puncta beeinflussen konnte. Meine Daten weisen darauf hin, dass in der Abwesenheit von *Nrg3* die PSD-95-positiven Puncta reduziert sind.

Nrg1 ist in propriozeptiven Neuronen essentiell für die Entstehung von Muskelspindeln (Hippenmeyer et al., 2002). Das Fehlen des ErbB2-Rezeptors im Muskel führt zur Abwesenheit von Muskelspindeln (Andrechek et al., 2002; Leu et al., 2003). ErbB2 spielt eine wichtige Rolle in der Übertragung von *Nrg1*-Signalen, kann aber *Nrg1* aber nicht direkt binden, das bedeutet, ErbB2 benötigt einen Ko-Rezeptor im Muskel, um seine Funktion auszuüben. Die molekulare Identität des Ko-Rezeptors war unbekannt. Ich verwendete konditionelle Mausmutanten, um die ErbB3 und ErbB4 Rezeptoren muskelspezifisch auszuschalten. Ich konnte zeigen, dass *ErbB3* für die Differenzierung von Muskelspindeln essentiell ist, während die Mutation von *ErbB4* weder Anzahl noch Größe der Muskelspindeln beeinträchtigte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue MRF' (Jerpseth et al., 1992)

2.1.2 Plasmide

Probe: Nrg3#F12 antisense-Probe; Verdau mit Nhe1; T7 RNS-Polymerase

Probe: GAD67 antisense-Probe; Verdau mit BAmHI; T7 RNS-Polymerase

2.1.3 Antikörper

Die angegebenen Antikörper wurden in der Immunhistologie angewandt und von den angegebenen Quellen bezogen (Tabelle 2.1):

Tabelle 2.1 Antikörper

Spezifität	Spezies	Quelle	Verdünnung
ErbB4	Meerschweinchen	im Labor von Carmen Birchmeier generiert	1:5000 (Gehirn)
Nkx2.1	Kaninchen	SantaCruz (sc-13040)	1:500
GFP	Ratte	Nacalai tesque (04404-84)	1:1500
Parvalbumin	Kaninchen	Swant (PV 25)	1:3000
Parvalbumin	Ziege	Swant (PVG 214)	1:3000
Neuregulin3	Ziege	Neuromics (GT15021-100)	1:3000
GFAP	Kaninchen	DakoCytomation (Z033401-2)	1:1000
MAP2	Kaninchen	Chemicon (AB5622)	1:1000
NeuN	Maus	Chemicon (MAB377)	1:1000
Pro-CCK	Kaninchen	Andrea Varro	1:10000
Cr	Kaninchen	Swant (7699/4)	1:3000
Sst	Ratte	Millipore (AB5494)	1:3000
Cb	Kaninchen	Swant (CB-38a)	1:3000
nNos	Kaninchen	Zymed (61-700)	1:500
PSD-95	Maus	Dianova (ABR-01205)	1:200

vGlut1	Kaninchen	Synaptic Systems (135303)	1:1500
Egr3	Kaninchen	Santa Cruz (sc-191)	1:300
Kollagen IV	Ziege	Millipore (AB769)	1:1000
Myosin	Maus	Sigma (M4276)	1:100

2.1.4 Mauslinien

Alle Mäuse in dieser Studie wurden für mehrere Generationen mit C57Bl/6J rückgekreuzt. Als Wildtyp Kontrolltiere verwendete ich C57Bl/6J-Mäuse aus eigener Zucht.

***ErbB4*^{-/-}**

ErbB4-mutante Mäuse sterben während der Embryogenese wegen einer Fehlentwicklung des Herzens (Gassmann et al., 1995). Diese Letalität wurde durch transgene Expression von *ErbB4* unter Kontrolle des MHC („myosin heavy chain“)-Promotors im Herzen überwunden (Tidcombe et al., 2003). Dieser Stamm wird als „heart-rescued“ *ErbB4*-mutant bezeichnet. Das Transgen exprimiert *ErbB4* im Herzen, aber nicht in anderen Geweben, insbesondere nicht im Gehirn. Ich habe in dieser Arbeit *ErbB4*- Kontroll und mutante Mäuse verglichen, die beide ein Transgen trugen.

***GAD67*^{GFP}**

Die *GAD67*^{GFP}-knock-in-Maus wurde 2003 von Tamamaki und Kollegen hergestellt (Tamamaki et al., 2003). Heterozygote Tiere mit C57Bl/6 Hintergrund exprimieren GFP unter der Kontrolle des *GAD67*-Lokus.

***Nrg3*^{-/-}**

Der *Nrg3*-mutante Mausstamm wurde von Dr. Thomas Müller hergestellt. Dabei wurde das zweite Exon des *Nrg3*-Gens durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Dieser Austausch führt zum Verlust der Sequenzen, die den N-terminalen Teil der EGF Domäne von *Nrg3* kodieren, und resultiert zusätzlich in einer Frameshift-Mutation. *Nrg3*-mutante Mäuse sind lebensfähig.

ErbB3^{ff}

Die ErbB3^{ff} wurde von Dr. Thomas Müller hergestellt. Die Klonierung des Targeting Vektors erfolgte durch homologe Rekombination (nach Riethmacher et al., 1997). Zwei loxP Sequenzen wurden 5´ von Exon 10 und 3´ von Exon 16 eingeführt. Das humane ERBB3 Allel ersetzte z.T. Exon 12 von der BclI-Restriktionsschnittstelle (Position 1569 in NM_001982) bis einschließlich Exon 16. Die Neomycin-Resistenz-Kassette wurde durch partielle Cre-Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) entfernt.

ErbB4^{ff}

Die ErbB4^{ff}-Maus wurde von Long und Kollegen etabliert (Long et al., 2003). Das zweite Exon des ErbB4-Gens wurde von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Die Deletion des zweiten Exons führt zu einer Frameshift-Mutation.

Lbx1^{Cre,ki17}

Lbx1^{Cre,ki17} Mäuse wurden von Dr. Hagen Wende hergestellt. Die Lbx1^{Cre} Mutation wurde durch homologe Rekombination in ES Zellen eingeführt. Die kodierende Sequenz der Cre-Rekombinase, sowie eine Neomycin-Resistenz-Kassette mit flankierenden *Frt* Sequenzen, wurden an das ATG Startkodon von Exon 1 des Lbx1-Gens fusioniert. Die Neomycin Kassette wurde durch Verpaarung von Lbx1^{Cre} Neo mit der FLPe „deleter“ Mauslinie entfernt (Vasyutina et al., 2007). Eine transgene Mauslinie wurde durch Pronukleus- Injektion des Lbx1^{Cre} Konstrukts generiert.

2.1.5 Nährmedien

Medien und Platten für die Kultivierung der Escherichia coli-Stämme wurden gemäß Standard-Protokollen verwendet (Sambrook und Russel, 2001). Die Konzentration von Ampicillin in Agar und Medien betrug 100 µg/ml.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNS und DNS-Fragmenten

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNS erfolgte durch Alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). In größerem Maßstab wurde die Isolierung mit dem Plasmid-Maxi-Präparations-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Isolierung von DNS-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin Extract II“-Kits (Macherey- Nagel; (Vogelstein und Gillespie, 1979)).

2.2.2 Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren und Transformation kompetenter Bakterien

Restriktionshydrolysen von Plasmid-DNS wurden mit Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Berger und Kimmel, 1987; Sambrook und Russel, 2001). Die Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach Inoue et al., 1990 ("Heat Shock"; Inoue et al., 1990).

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren aus der Nachzucht eingesetzt (Saiki et al., 1985). Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden (Innis et al., 1989). Nachfolgend sind die verwendeten Genotypisierungs-PCR-Programme inklusive der eingesetzten Primer und MgCl₂-Konzentrationen angegeben:

ErbB4^{-/-}

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

B4#20sense: 5'-tgtgcgaggaacagagaac-3'

B4#22 sense: 5'-ccgcaggaaggagaggtc-3'

B4#23antisense: 5'-ctgcacgagactagttagac-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

60°C 1 min 30x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: ErbB4^{-/-} Allel = 320bp; wt Allel =150bp

ErbB4-MHC

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

B4#54sense: 5'-agctgtggtccacattcttcagga-3'

B4#51 antisense: 5'-acttgcgcaaggctcggtactgct-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

70°C 1 min 39x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: 600bp

ErbB3^{ff}

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

B3-DA-sense: 5'-ttgcagtgagtcacacagacacct-3'

B3-CS3-antisense: 5'-tctccttgatgatcatgaagaacttg-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

70°C 1 min 40x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: wt 470bp, fl 350bp

***ErbB4* Wildtyp-Allel**

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

B4#20sense: 5'-caaatgctctctctgttc-3'

B4#23antisense: 5'-catctatcattgcaaccag-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

58°C 1 min 37x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: 314 bp

***ErbB4-Neo*-Allel**

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

B4#20sense: 5'-caaatgctctctctgttc-3'

B4#22 antisense: 5'-gttctaattccatcagaagc-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

58°C 1 min 37x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: 400bp

***Lbx1*^{Cre}**

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Lbx1-sense: 5'-cgccttctctcgaccgtc-3'

Lbx1-antisense: 5'-ggcagcccgaccgac-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

60°C 1 min 37x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: 500bp

GAD-67^{GFP}

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

eGFP1-sense: 5'-tcg agc tgg acg gcg acg taa a-3'

eGFP2-antisense: 5'-tag tgg ttg tcg ggc aag cag ca-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

60°C 1 min 37x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: 600bp

Nrg3-Neo

a) MgCl₂-Konzentration: 2 mM

b) Primer:

N3 mut neu #1-sense: 5'-cctgcgtgcaatccatcttgttca-3'

N3 mut neu #2: 5'-caaaatcctgcgaagctaaaagggc-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

65°C 1 min 40x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: 492bp

Nrg3 Wildtyp-Allel

a) MgCl₂-Konzentration: 2 mM

b) Primer:

N38B8-sense: 5'-tgagtgctacgatacaactatgga-3'

N3ex6: 5'-gacaaggacctggcgtattgtctca-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min

65°C 1 min 40x

72°C 1 min

4°C ∞

d) Produktlänge: 393bp

2.2.4 *In vitro*-Transkription

Synthese von Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten als Proben für die *in-situ*-Hybridisierung. Zunächst wurde die Plasmid-Matrize zur Transkriptbegrenzung mittels Restriktionshydrolyse linearisiert, isoliert und in H₂O aufgenommen. Die Synthese des *in vitro*-Transkripts fand in folgendem Ansatz für 1,5h bei 37°C statt:

1 µl linearisierte Plasmid-DNS (1 µg/µl)

2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)

2 µl DIG/FITC-Labeling-Mix (Roche)

0,5 µl RNase-Inhibitor (40U/µl, Invitrogen)

13,5 µl DEPC-H₂O

1 µl RNS-Polymerase (20U/µl, Roche)

Das Transkript wurde durch Verwendung des „RNeasy Cleanup“-Kits (Qiagen) aufgereinigt und in 100 µl 50 % Formamid/50 % H₂O aufgenommen.

2.2.5 Histologische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Immunhistologische Färbungen oder *in situ*-Hybridisierungen wurden auf Gefrierschnitten durchgeführt. Die Embryonen oder Gehirngewebe wurde in Fixierlösung (4 % PFA in PBS) für drei Stunden fixiert. Adulte Mäuse wurden mit Fixierlösung perfundiert, 3h nachfixiert, ÜN in PBS gewaschen und einen weiteren Tag in 25% Sucrose zur Kryoprotektion bei 4°C inkubiert, jeweils unter leichter Bewegung. Muskelgewebe wurde direkt ohne Fixierung eingefroren und nur die Schnitte vor der Färbung fixiert. Das Einfrieren erfolgte in „Tissue-Tek“ (= „OCT-Compound“, Sakura) in einer Einbettform („Peel-A-Way“, Thermo Scientific) auf einer Alkohol/Trockeneis-Mischung. Die Schnitte wurden im Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -12°C und -15°C angefertigt, wobei die Schnittdicke bei 12 µm lag. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträgern (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt eingefroren. Wie auch die gefrorenen Präparate konnten die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.5.2 Herstellung von Schnitten mit dem Schlittenmikrotom

Immunhistologische Färbungen von adulten Gehirnen wurden auf Mikrotomschnitten durchgeführt. Dazu wurden die präparierten Gehirne nach Perfusion und mindestens 3h Nachfixierung in 20% Sucrose, 20% Gelatine in PBS in einer Einbettform („Peel-A-Way“, Thermo Scientific) auf einer Alkohol/Trockeneis-Mischung eingefroren und bei einer Temperatur von -20°C mit 40µm Dicke geschnitten. Die flotierenden Schnitte wurden in 12-Well-Platten in PBS gesammelt und dort mit Antikörpern gefärbt.

2.2.5.3 Immunhistologie auf Gefrierschnitten des Gehirns

Die Gefrierschnitte wurden getrocknet und für 1h bei RT in 5 % Pferdeserum/PBX (PBS mit 1 % TritonX-100) blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Schnitte dreimal für je 10 min mit PBX gespült und für 1h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBX wurden die Schnitte mit „Immu-Mount“ (Thermo Scientific) eingedeckt.

Zur Steigerung der Signalintensität der Antikörperfärbungen auf Muskelgewebe wurde das

TSA System (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA) verwendet. SYBRgreen I (Molecular Probes, Eugene, OR) wurde für die Kern-Färbung eingesetzt. Die verwendeten sekundären Antikörper (Dianova), konjugiert mit Cy2, Cy3 oder Cy5, wurden in 50% Glycerin/Wasser rekonstituiert, bei -20°C gelagert in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

2.2.5.4 Immunhistologie auf flotierenden Schnitten

Die Schnitte wurden mit einem Pinsel in PBS in einer 12-Well-Platte aufgenommen und darin ("free-floating") blockiert und angefärbt. Die Blockierung erfolgte für eine Stunde in 5 % Pferdeserum/PBX. Der primäre Antikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt und die Schnitte wurden für ca. 48 h damit bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Nach dem Waschen in PBX über mehrere Stunden erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper über Nacht. Nach dreimaligem Waschen in PBX wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Prolong Gold (Invitrogen) eingedeckt.

2.2.5.5 Immunhistologie auf Kryostatschnitten- Muskel

Die Gefrierschnitte wurden getrocknet und für 1h bei RT in TSA-Blockierungslösung (5% Pferdeserum, 0,25% TSA™ Blocking Reagent („Tyramide Signal Amplification“; PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA), 0,1% TritonX-100) blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 5% Pferdeserum/PBX über Nacht bei 4°C. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 15min in PBX gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper in 5% Pferdeserum/PBX bei RT inkubiert. Nach weiterem Spülen in PBX, zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds wurden die Schnitte mit „Immu-Mount“ (Thermo Scientific) eingedeckelt.

2.2.5.6 Immunzytologie

Die Deckgläschen mit den adhärennten Zellen wurden vorsichtig mit PBS gespült, mit 3,7% Formaldehyd/PBS bei RT oder Methanol/Essigsäure (95:5, anti-Nrg3-IHC) bei -20°C für 15min fixiert und mit PBS dreimal gewaschen. Die Blockierung mit 5 % Pferdeserum/PBX erfolgte am gleichen Tag und die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht. Danach wurden die Deckgläschen dreimal für je 15 min mit PBX gewaschen und für 1h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBX wurden die Deckgläschen mit Prolong Gold (Invitrogen) auf Objektträgern fixiert.

2.2.6 In situ-Hybridisierung

Die Objektträger mit den Gefrierschnitten wurden für 30 min mit 4 % PFA in PBS bei RT fixiert, dreimal mit PBS gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte in Hybridisierungspuffer (50 % entionisiertes Formamid, 5x Denhardts(2%Ficoll400, 2%Polyvinylpyrrolidone, 2%BSA), 5x SSC(3MNaCl, 0,3M Natriumcitrat), 250µg/ml Hefe-tRNS, 500µg/ml Salmon Sperm DNA) für 2 h bei RT. Die DIG/FITC -markierten Sonden wurde für 5 min bei 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf etwa 100-200 ng/150 µl in Hybridisierungspuffer verdünnt. Die Hybridisierungslösung wurde auf die Objektträger aufgebracht und mit silanisierten Deckgläsern bedeckt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C in einer mit 50 % Formamid/ 5x SSC befeuchteten Kammer durchgeführt. Darauf wurden die Deckgläser zweimal bei 60°C für 20 min in 2x SSC/50% Formamid/0,1% N-Lauroylsarcosin gewaschen. Nach erneutem Waschen in Lösung1 (10mM Tris,pH8.0; 1mM EDTA;500mM NaCl) wurden die Objektträger bei 37°C für 15min in RNS-enthaltender Lösung1 inkubiert (RNaseA: Sigma#R4642; 20µg/ml RNaseA in Lösung1). Es erfolgten weitere Waschschrte in 2xSSC/0,1% N-Lauroylsarcosin und 0,2xSSC/0,1% N-Lauroylsarcosin jeweils bei 37°C für 20min. Die Objektträger wurden dann in MABT-Puffer (0,1 M Maleinsäure, 150mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7.5) überführt und 5 min inkubiert. Es folgte ein Blockierungsschritt mit Blockierungslösung (10 % Ziegenserum, 2% Blockierungssubstanz von Roche, # 1096176) für 60 min. **Inkubation1:** Die Inkubation mit dem anti-FITC-Antikörper-POD (1:1500; Roche#1-426-346) in Blockierungslösung erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Objektträger 6-fach für je 10 min mit MABT-Puffer gewaschen. Die Objektträger inkubierten hierauf für 10min in Lösung A (PBS mit 10mM Imidazol), dann wurden sie für 30min mit der Färbelösung (1:100 Fluorescein-Tyramid (10mg/ml in DMF), 0,001 % H₂O₂ in PBS mit 10mM Imidazol) für etwa 30min benetzt. Nach 5 Waschrten in PBS+0,1%Tween wurde die Färbung mit dem Fluoreszenzmikroskop geprüft.

Danach wurde die Peroxidase in 4% PFA/PBS für eine Stunde sowie 3% H₂O₂ in PBS inaktiviert. Hierauf folgten weitere Waschschrte in PBS (3fach für 5min) und MABT (10min) bei RT. Nun folgte eine zweite Antikörperinkubation (anti-DIG-Antikörper-POD; Roche, #1-207-733) über Nacht sowie die Signal Amplifikation unter Benutzung eines anderen Fluorophor-Thyramid-Systems (1:75 Rhodamin-Thyramid (10mg/ml in DMF)) ebenso wie „Inkubation1“. Anschließend an die Waschschrte in PBS+0,1%Tween wurden die Präparate mit „Immu-Mount“ eingedeckt.

Das Thyramid Reagenz ist an Fluorophochrome (Fluorescein, Rhodamin) gebunden und wurde mithilfe der POD entwickelt. Diese reagiert mit H_2O_2 , daraufhin wird Thyramid aktiviert und bindet kovalent an Tyrosine in Proteinen, die nahe der POD lokalisiert sind. Somit wird das Signal verstärkt (Hopman et al., 1998).

2.2.7 Neuronale Zellkultur

Um primäre kortikale Zellen in einer sehr geringen Dichte ohne Astrozyten zu kultivieren, adaptierte ich verschiedene Protokolle (Banker und Cowan, 1977; Meier und Grantyn, 2004; Pyott und Rosenmund, 2002; Ting et al., 2011). Zur Vorbereitung wurden die Deckgläschen in 3,7% HCL/Wasser über Nacht gewaschen, anschließend einen weiteren Tag dreimalig in entionisiertem Wasser gespült. Es folgten weitere Waschschrte in 70% und anschließend 99% Ethanol (vergällt), in dem die Deckgläschen gelagert werden konnten. Zur Poly-L-Lysin(PLL)-Beschichtung wurden die Deckgläschen in den Petrischalen steril platziert, getrocknet und über Nacht mit 10 μ g/ml PLL (P2636, Sigma) in Borat Puffer (100mM Borsäure, 75mM NaCl, pH8.5) bei 37°C inkubiert. Nach der PLL-Beschichtung wurden die Deckgläschen bei RT zweimal über 12 h mit Wasser gewaschen, 2h getrocknet und für 20min mit UV-Licht sterilisiert. Einen Tag vor Herstellung der Kultur werden die Deckgläschen mit Medium im Inkubator platziert.

Zur Herstellung der neuronalen Zellkultur wurden die präparierten Kortexe Neugeborener oder aus Mäusen mit dem Alter P1 in einer Enzymlösung (0,2mg/ml Cystein, 1mM $CaCl_2$, 0,5mM EDTA, 2 Units Papain in 1ml DMEM) für etwa 1h verdaut. Anschließend wird die Protease mittels DNase-Ovomucoidlösung (25mM HEPES, 20mM Glukose, 3mg/ml Ovomuroid (Trypsin Inhibitor, Sigma T9003), 1,5 kU DNase (Sigma D5025) in Leibovitz 15-Medium) für 5min abgestoppt. Schließlich werden die Zellen in Neurobasal-Medium (2% B27 (17504-044, Gibco), 600 μ M L-Glutamine (L-Gln Gibco#25030), 1x Penicillin-Streptomycin in Neurobasal-A (GIBCO BRL Cat# 10888-022)) trituriert, gezählt und in 12-Well-Platten auf PLL-beschichteten Deckgläschen in Neurobasal-Medium mit einer Dichte von 3x oder 6x 10^4 Zellen pro Well (12-Well-Platte; 1,9cm² Well) ausgesät. Rekombinantes Nrg1 (NRG1- β 1 R&D Systems; #NP_039250) wurde in 0,1% BSA/PBS mit einer Konzentration von 0,1 μ g/ μ l gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die kortikalen Zellen wurden mit 0,2 μ g/ml exogenem Nrg1 oder BSA-Lösung für 2 Tage inkubiert. Zur Herstellung von

konditioniertem Medium wurden kortikale Zellen parallel in höherer Dichte kultiviert (9×10^4 Zellen/Well) und dieses Medium für einen Mediumwechsel der gering konzentrierten Kulturen alle 7 Tage benutzt.

2.3 Analyse und Quantifizierung

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte mittels Durchlicht- oder Fluoreszenzmikroskopie. Anschließend wurden die Daten mittels Fiji- und Cell Profiler-Software ausgewertet oder ausgezählt.

2.3.1 Quantifizierung der ErbB4+ Interneurone

Für die Quantifizierung und Charakterisierung ErbB4-exprimierender Zellen wurden $40\mu\text{m}$ Microtomschnitte angefertigt. Die immunhistologische Färbung erreichte die gesamte Schnittdicke. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Laser-Scanning-Mikroskop (Pascal, Zeiss ZEN-Software). Für die Bestimmung der Dichte der ErbB4-Interneurone wurden die Schnittdicke von $40\mu\text{m}$ und die Höhe/Breite des gewonnenen Bildes zur Berechnung herangezogen. Die Interneurone wurden vorwiegend manuell ausgezählt und mittels dem Plugin "Cell-Counter" der Fiji-Software markiert.

2.3.2 Analyse der Fluoreszenzbilder von neuronalen Zellkulturen

Für die Quantifizierung der synaptischen Proteine auf immunhistologisch gefärbten Zellkulturen nutzte ich das Laser-Scanning-Mikroskop. Die Einstellungen des Mikroskops kann dem Anhang (LSM-Parameter) entnommen werden, die Bilder wurden durch die LSM-Toolbox der Fiji-Software in die einzelnen Kanäle getrennt und als 8-bit-Bilder formatiert. Anschließend markierte ich manuell die Dendriten mit einer 30 Pixel ($=2,4\mu\text{m}$) starken Linie, diese diente in der Cell-Profiler-Software als Maske für die Analyse der auf dem Dendriten lokalisierten Proteine und Berechnung der Dendritenlänge.

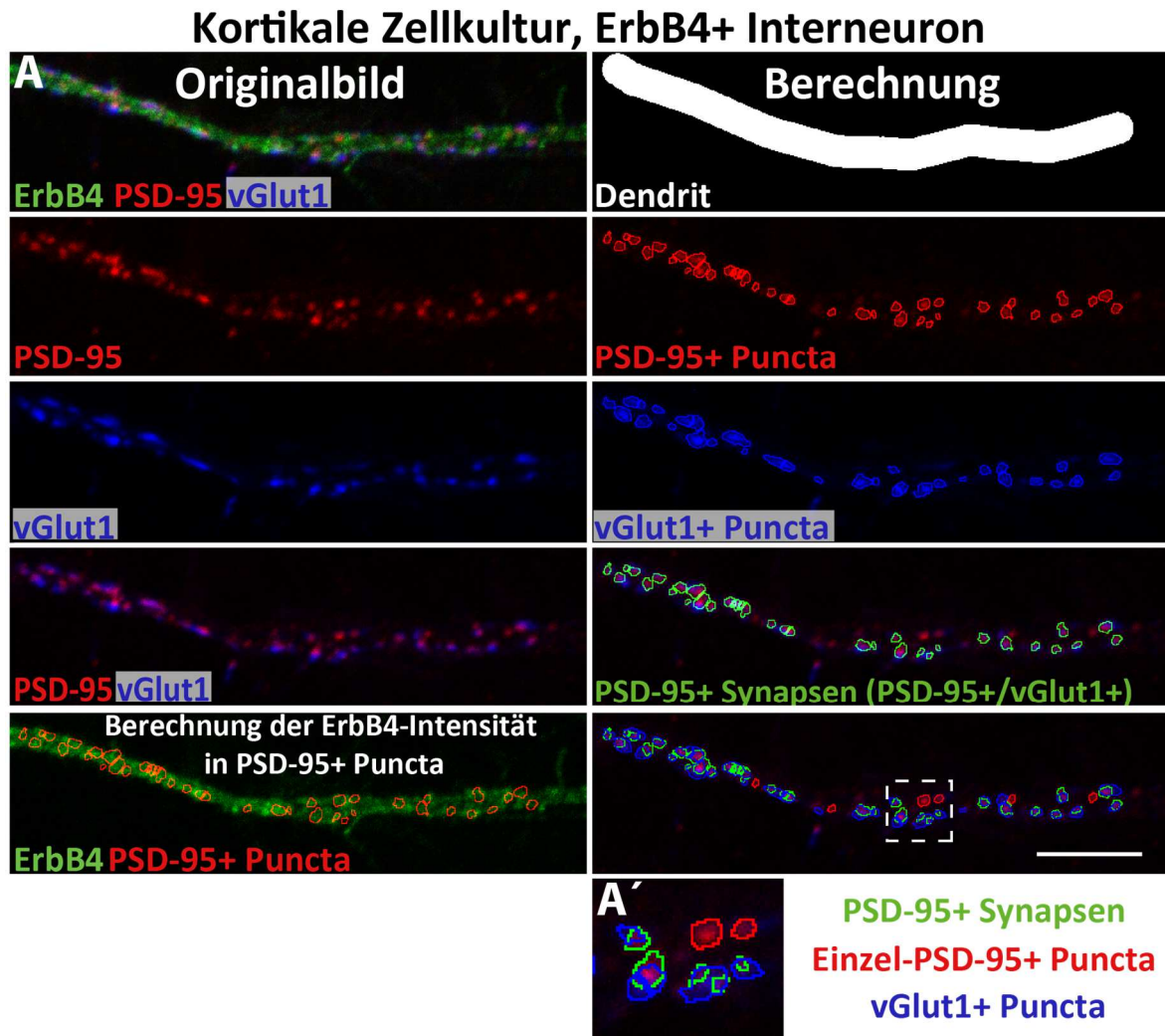


Abbildung 2.1 Automatische Bildanalyse synaptischer Proteine von Neuronenkulturen

Analyse der Expression von synaptischen Proteinen kortikaler Zellkulturen. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Im Originalbild markiert jede Farbe die Expression eines Proteins auf dem Dendriten (PSD-95: rot, vGlut1: blau, ErbB4: grün). Jeweils Threshold, Partikelgröße, Smoothingfilter und weitere Parameter zur Puncta-Identifizierung, d.h. die Programmierung der Bildanalyse, blieb unverändert. Die somit automatische Erkennung der Strukturen erlaubte die präzise Analyse einer Großzahl von Neuronen. **A)** Zunächst werden die Farbkanäle getrennt und die Bilder der PSD-95+ und vGlut1+ Strukturen als Punkte erkannt. Die Überlagerung von PSD-95+/vGlut1+ Strukturen bilden Synapsen. Folglich können synaptische und nicht-synaptische PSD-95+ Strukturen unterschieden werden. Durch Maskieren der Bilder von PSD-95+ Strukturen und der ErbB4-Färbung konnte festgestellt werden, dass ErbB4 in PSD-95+ Strukturen akkumuliert, da die Färbungsintensität in PSD-95+ Strukturen erhöht war. Die Anzahl, Größe und Intensität von PSD-95+ Strukturen sowie deren Intensität wurde ebenfalls automatisch ermittelt. Die visuelle Ausgabe der Quantifizierung erlaubte die Kontrolle der automatischen Analyse. **A')** Vergrößerung der Markierung synaptischer (grün) und nicht synaptischer (rot) PSD-95+ Strukturen (Puncta). (Software: Cell Profiler, Programmierung: Anhang)

Maßstab: 10µm

Den Threshold zur Identifizierung synaptischer Strukturen wählte ich relativ gering, um alle Signale zu beachten (siehe Tabelle 2.2). Die punktförmigen Erscheinungen der Proteine wurden erkannt, nach Größe, Anzahl und Überlappung sortiert und die Intensitäten gemessen. Es wurde jeweils die mittlere Intensität der punktförmigen Strukturen berechnet. Die Punctagröße erklärte sich aus der Fläche in μm^2 und wäre umso kleiner, je höher der Threshold gewählt würde. Nach Erkennung der Puncta ist die Pipeline so programmiert, dass sie jeweils Puncta identifiziert, die im betrachteten Bereich der Dendritenmaske liegen und ihre Ko-Lokalisation mit anderen Strukturen wurde ausgegeben. Im Weiteren wurde Größe und Intensität der z.B. der PSD-95-Puncta berechnet, die mit vGlut1 ko-lokalisierten.

Tabelle 2.2 **Parameter zur automatischen Identifizierung von synaptischen Strukturen**

Protein	Threshold	Punctagröße (Pixel)
PSD-95	0,25	5-55
vGLut1	0,25	5-55
ErbB4	0,5	Nur Intensitätsmessung
Nrg3	0,3	5-55

3 Ergebnisse

3.1 Die Identifizierung ErbB4-exprimierender Interneurone im Kortex

3.1.1 Kortikale GABAerge Interneurone exprimieren ErbB4

Das *ErbB4* Gen kodiert für einen membranständigen Rezeptor, der in Interneuronen des Vorderhirns exprimiert wird, die während der Embryonalentwicklung aus der medialen ganglionischen Eminenz tangential zum Kortex migrieren (Flames et al., 2004; Yau et al., 2003). Um die *ErbB4*-Expression während der Kortikogenese zu charakterisieren, führte ich eine immunhistologische Analyse an Gehirnen von Mäusen durch. Dabei benutzte ich ein in unserem Labor erzeugtes anti-ErbB4-Antiserum und einen Antikörper gegen Nkx2.1, einen Homeobox-Transkriptionsfaktor und Marker für Vorläuferzellen der ventrikulären und subventrikulären Schicht der medialen ganglionischen Eminenz (Nobrega-Pereira et al., 2008). Nkx2.1-exprimierende Zellen sind entscheidend an der Ausbildung GABAerger Interneurone des Kortex beteiligt (Flames et al., 2004; Lazzaro et al., 1991; Puelles et al., 2000; Shimamura, 1995; Sussel et al., 1999). In diesem Experiment konnte ich zeigen, dass ErbB4 selten in den Vorläuferzellen exprimiert wird, da nur wenige ErbB4+ Zellen Nkx2.1 ko-exprimierten. Stattdessen erschien ErbB4 vorwiegend in der Mantelzone der medialen ganglionischen Eminenz (Abb. 3.1). Das bedeutet, dass ErbB4 vorwiegend in postmitotischen Zellen ausgeprägt wird.

ErbB4 markiert GABAerge Interneurone des Kortex, d.h. *ErbB4* wird fast ausschließlich in kortikalen Interneuronen und nicht in glutamatergen Pyramidenzellen exprimiert (Fazzari et al., 2010; Fox und Kornblum, 2005; Neddens und Buonanno, 2010). Ich verifizierte diese Ergebnisse mit dem anti-ErbB4-Antiserum an Mäusen, die GFP (grün fluoreszierendes Protein) unter der Kontrolle des *Gad1*-Locus exprimierten (*GAD67^{GFP}*-knock-in). Mittels Immunhistologie konnte ich in den Regionen des präfrontalen und somatosensorischen Kortex zeigen, dass ErbB4-exprimierende Zellen ausschließlich GABAerge Zellen sind, d.h. alle ErbB4-positiven Neurone waren auch GFP-positiv (Abb. 3.2). Nur 26% der GFP+ Neurone im präfrontalen und 23% im somatosensorischen Kortex waren ErbB4-negativ. ErbB4 kann somit als Marker für einen Teil der GABAergen Interneurone genutzt werden (Abb. 3.2).

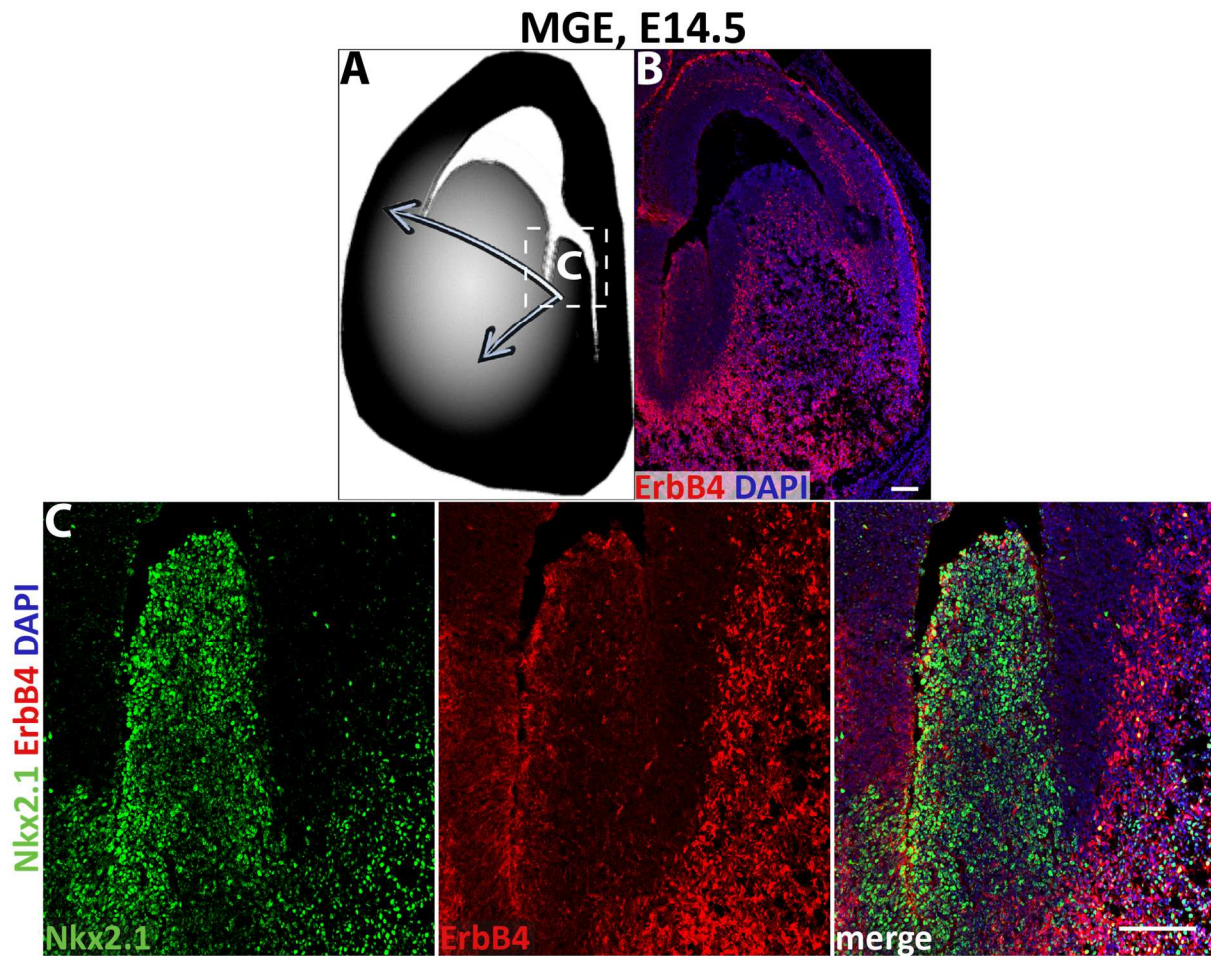


Abbildung 3.1 ErbB4 wird in postmitotischen Zellen der medialen ganglionischen Eminenz exprimiert

Analyse der Vorläuferzellen der kortikalen Interneurone durch Betrachtung der Nkx2.1 und ErbB4 Expression von Wildtyp Mausembryonen am Tag E14.5. Nkx2.1 markiert die ventrikuläre und subventrikuläre Schicht der MGE, die GABAerge Vorläuferzellen enthalten. **A)** Darstellung der Coronalebene eines E14.5 Embryos und der tangentialen Migration der Interneurone vom MGE zum Kortex (Pfeil oben) sowie der radialen Migration zum Striatum (Pfeil unten) **B)** (A) entsprechende Immunfärbung von ErbB4, DAPI (Kernfarbstoff): Im Bereich der MGE wurde der Rezeptor ErbB4 vorwiegend von postmitotischen Zellen der subventrikulären- und Mantelzone exprimiert. **C)** Vergrößerung der MGE: Nkx2.1-Zellen markieren die Vorläuferzellen der MGE. ErbB4⁺ Zellen migrieren Richtung Kortex und ko-exprimieren nur selten Nkx2.1. (MGE: mediale ganglionische Eminenz)

Maßstab B, C: 100µm

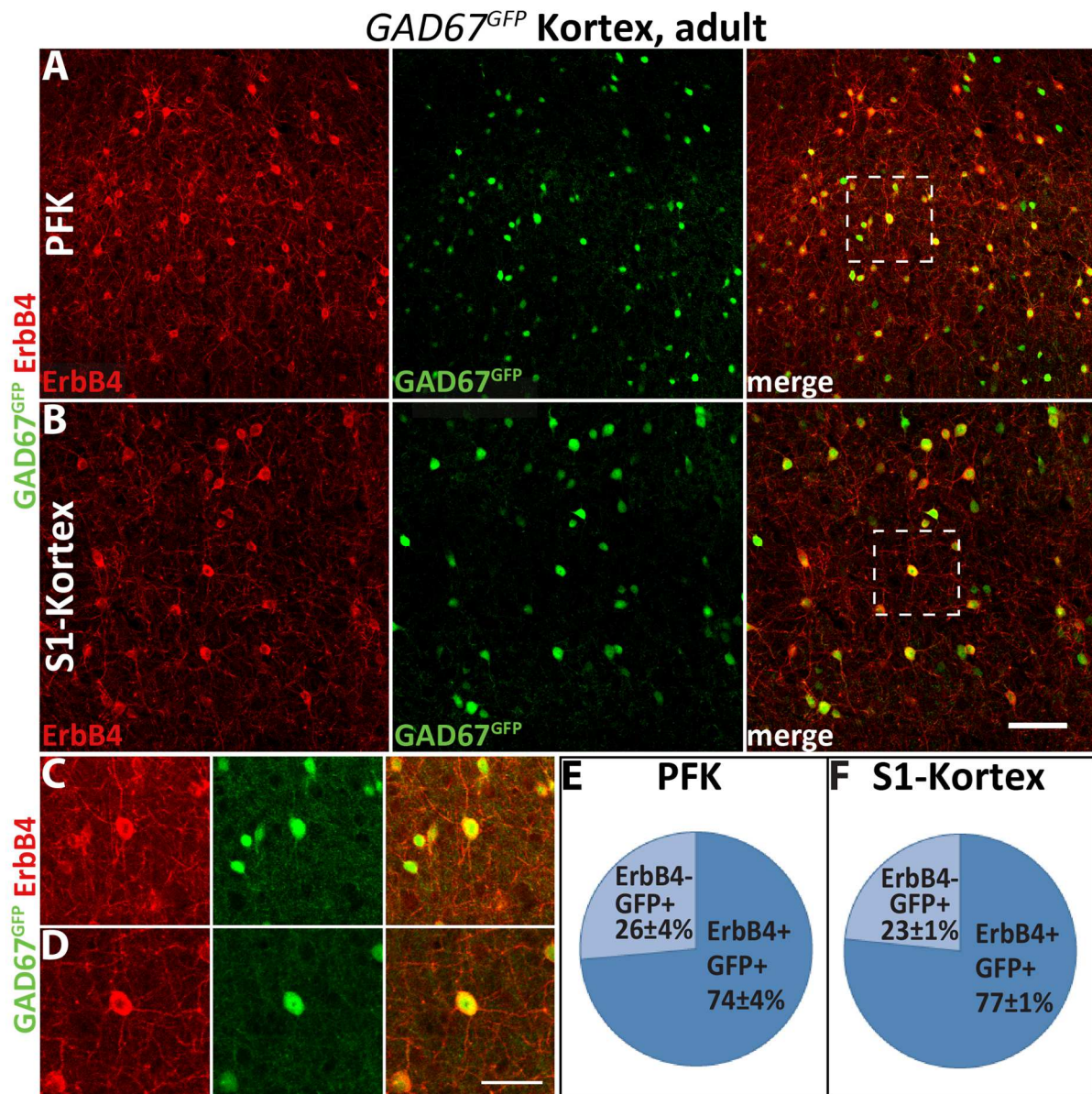


Abbildung 3.2 ErbB4 markiert GABAerge Interneurone im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex

Immunhistologische Analyse ErbB4-exprimierender Zellen im präfrontalen (PFK) und primären somatosensorischen Kortex (S1) von adulten *GAD67^{GFP}*-knock-in-Mäusen. Die Analyse der Proteine ErbB4 und GFP zeigte, dass ErbB4 in beiden Regionen ausschließlich in GABAergen Interneuronen exprimiert wird. **A-C)** Fluoreszenzbilder des PFK und S1. **C,D)** Vergrößerung GABAerger Interneurone im PFK (C) und S1 (D), die ErbB4 ko-exprimierten. **E,F)** Quantifizierung der GABAergen Interneuronenpopulation: 74% (PFK) und 77% (S1) der GABAergen *Gad67^{GFP}*+ Zellen ko-exprimierten den Rezeptor ErbB4, alle ErbB4+ Zellen ko-exprimierten *Gad67^{GFP}*. (PFK: präfrontaler Kortex; S1-Kortex: primärer somatosensorischer Kortex; GABA: Gamma-Aminobuttersäure, GAD67: Glutamat Decarboxylase mit dem MW 67, GFP: Grün fluoreszierendes Protein; SEM angegeben, n=4 Tiere)

Maßstab A: 100µm

Maßstab B: 50µm

3.1.2 Nrg3-Expression in kortikalen Neuronen

Nrg3 kodiert für einen Liganden der Neuregulin-Familie und wird im Zentralnervensystem exprimiert (Zhang et al., 1997). Die EGF-Domäne von *Nrg3* kann den ErbB4-Rezeptor binden und aktivieren. Zur Identifizierung *Nrg3*-exprimierender Zellen im Kortex adulter Mäuse führte Thomas Müller eine *in situ*-Hybridisierung durch. Die Verwendung von jeweils zwei Sonden im gleichen Experiment machte es möglich, sowohl *Nrg3* mRNA als auch Interneurone durch GAD^{67} - oder CamKII-exprimierende Pyramidenzellen („Calmodlin-dependent kinase II“; Daten nicht gezeigt) zu markieren (Abb. 3.3A).

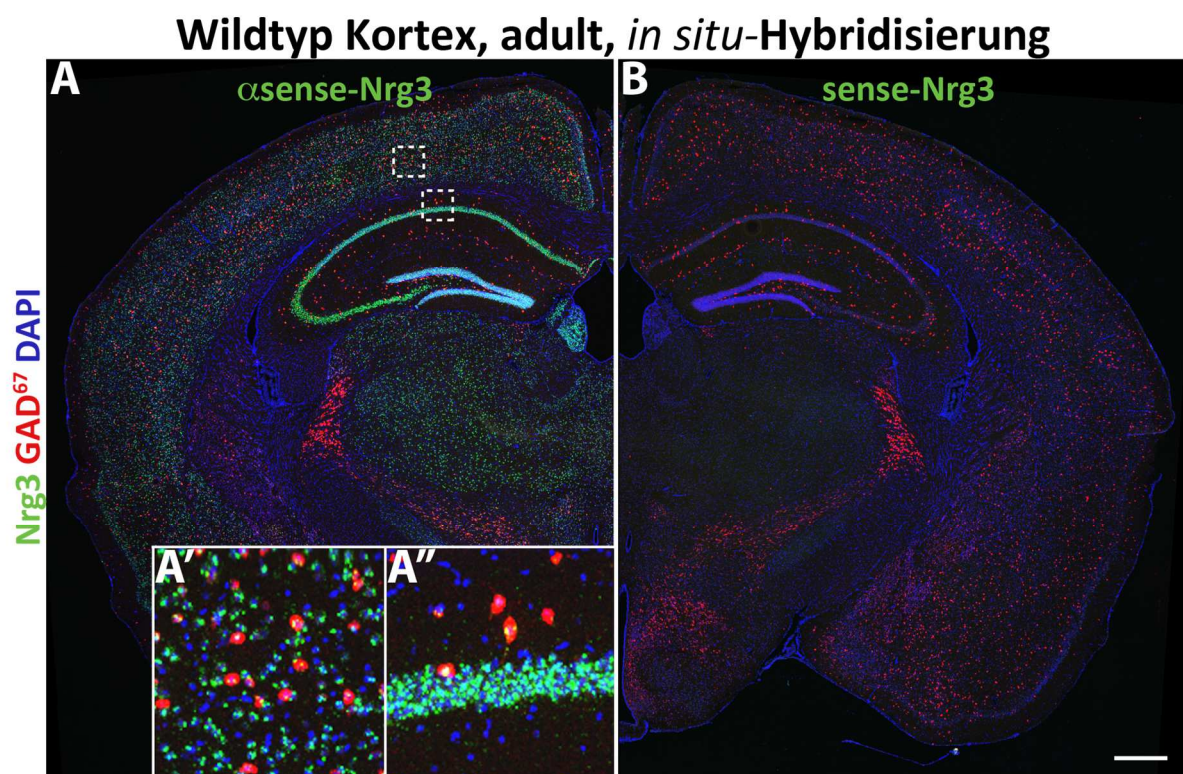


Abbildung 3.3 *Nrg3* mRNA ist in kortikalen Neuronen, auch in GABAergen Interneuronen lokalisiert

Analyse *Nrg3*-exprimierender Zellen durch Doppel-Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) des Kortex einer adulten Wildtyp Maus mit einer *Nrg3*-spezifischen Probe (grün) in Kombination mit einer GAD^{67} -spezifischen Probe (rot) und Kernfärbung (DAPI, blau) zeigte, dass *Nrg3* mRNA in allen kortikalen Schichten und Neuronen, auch GABAergen Interneuronen des Kortex, lokalisiert war. **A)** *In situ*-Hybridisierung mit der *Nrg3*-antisense Probe zeigte die *Nrg3*-Expression in GABAergen Interneuronen (rot) des Kortex sowie in den Pyramiden- und Körnerzellschichten des Hippocampus. Der Großteil der kleinen Kerne der Astrozyten war frei von *Nrg3* mRNA. **B)** Kontrollhybridisierung mit der *Nrg3*-sense Probe führte zu keinem Signal. (Beobachtung von Thomas Müller).

Maßstab: 1mm, Zoom: 8-fach

Durch die Beobachtung von *Nrg3* mRNA in CamKII- und GAD67-positiven Zellen konnte nachgewiesen werden, dass *Nrg3* von inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen exprimiert wurde (Abb. 3.3). *Nrg3* mRNA konnte kaum in den kleinen Kernen der Gliazellen beobachtet werden.

3.1.3 Quantifizierung der Interneurone im Kortex *Nrg3*-mutanter Mäuse

Ein *Nrg3*-mutanter Mausstamm wurde von Dr. Thomas Müller hergestellt. Dabei wurde das zweite Exon des *Nrg3*-Gens durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Dieser Austausch führte zum Verlust der Sequenzen, die den N-terminalen Teil der EGF-Domäne von *Nrg3* kodieren und resultierte zusätzlich in einer Frameshift-Mutation. *Nrg3*-mutante Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar, und homozygote Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen werden in der erwarteten Anzahl entsprechend der Mendelschen Gesetze beobachtet. Verhaltenstests zeigen, dass *Nrg3*-Mutanten hyperaktiv im „Open Field Test“ sind und eine erhöhte Impulsivitäts-Kontrolle aufweisen (nicht publizierte Daten aus dem Labor von August Smit, Amsterdam). Da ErbB4 der einzige Rezeptor für *Nrg3* ist und im Kortex von *ErbB4*-mutanten Mäusen eine reduzierte Anzahl von Interneuronen beschrieben wurde, untersuchte ich die Population der ErbB4+ Interneurone in *Nrg3*-mutanten Mäusen (Buonanno und Fischbach, 2001; Fazzari et al., 2010; Fisahn et al., 2009; Zhang et al., 1997). Um festzustellen, ob die Anzahl und Identität von ErbB4-Interneuronen im Kortex adulter *Nrg3*-mutanter Mäuse verändert ist, analysierte ich den präfrontalen Kortex, den primären somatosensorischen Kortex und den Hippocampus. Dabei ermittelte ich die Dichte der ErbB4+ Zellen und seine Ko-Expression mit Interneuronenmarkern.

ErbB4+ Zellen sind in allen kortikalen Schichten, allerdings in unterschiedlichen Dichten, vorhanden (Abb. 3.4). In der kortikalen Schicht I konnte ich die geringste Dichte beobachten. Mit mehr als 11.000 Zellen pro mm³ Gewebe im prälimbischen und infralimbischen präfrontalen Kortex beobachtete ich eine höhere Dichte von ErbB4+ Interneuronen als im primären somatosensorischen Kortex, bei dem die Anzahl 9.000 Zellen pro mm³ betrug. Die geringste Dichte beobachtete ich im Hippocampus mit 5.000 ErbB4+ Zellen pro mm³. Die durchschnittliche ErbB4-Zelldichte des präfrontalen Kortex, primären somatosensorischen Kortex und des Hippocampus war in *Nrg3*^{-/-} Mäusen nicht signifikant verändert (Abb. 3.4E).

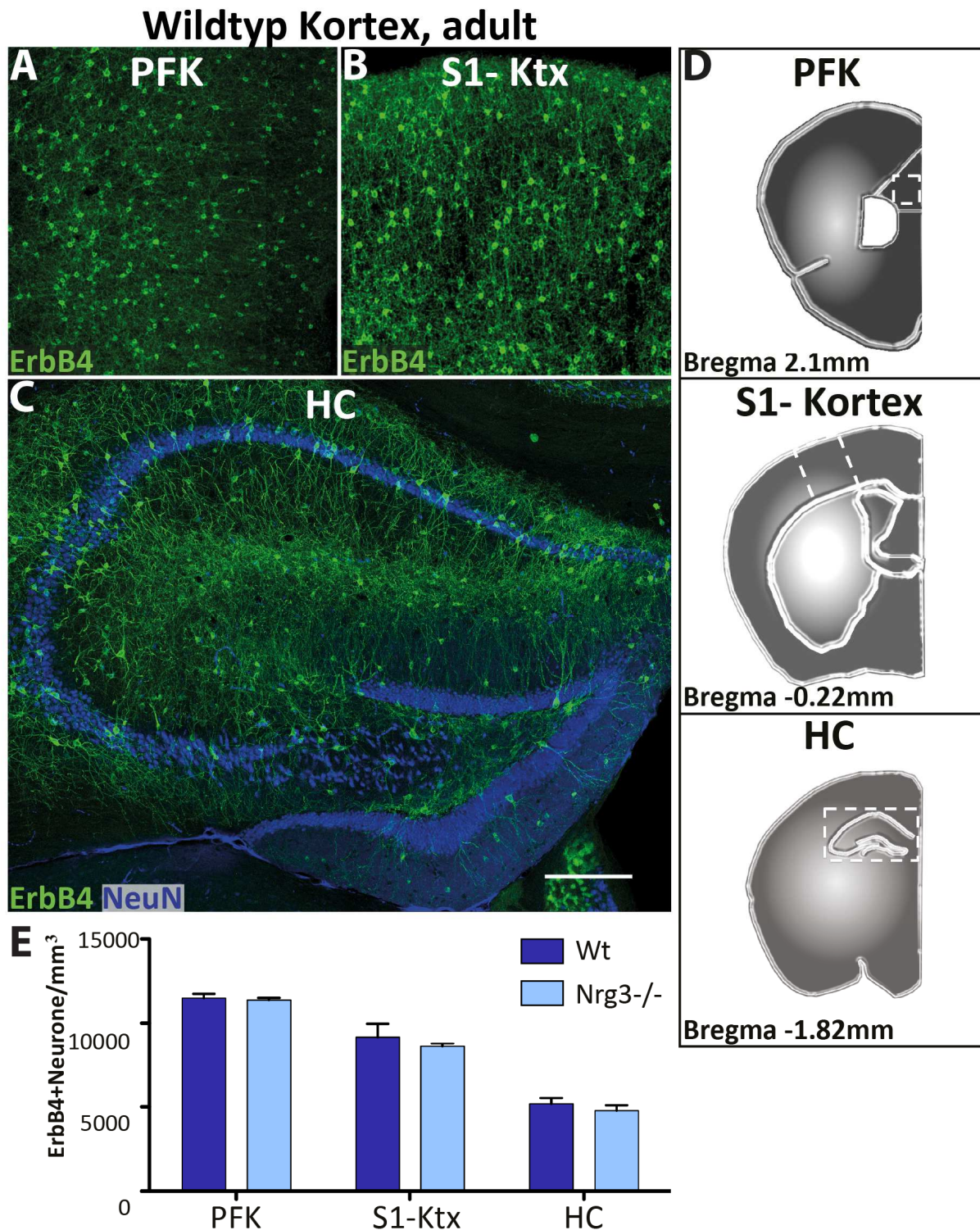


Abbildung 3.4 Die Anzahl der ErbB4+ Interneurone im Kortex adulter *Nrg3*^{-/-} mutanter Mäuse ist nicht verändert

Um die Anzahl von ErbB4+ Interneuronen im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex und im Hippocampus zu bestimmen, wurden ErbB4- und NeuN-exprimierende Neurone analysiert. **A-C**) Immunfluoreszenzbilder der analysierten Hirnregionen einer Wildtyp Maus: präfrontaler Kortex (A), primärer somatosensorischer Kortex (B), Hippocampus (C). **D**) Schematische Darstellung der analysierten Regionen mit Angabe des Bregma-Levels (nach Mouse Brain Atlas von Franklin & Paxinos). **E**) Im Vergleich

zu Kontrolltieren war die Dichte ErbB4-exprimierender Interneurone in keiner der analysierten kortikalen Regionen von *Nrg3*-mutanten Mäusen verändert. (S1-Ktx: primärer somatosensorischer Kortex, PFK: Präfrontaler Kortex, HC: Hippocampus; SEM angegeben; n=3 Tiere pro Gruppe)

Maßstab: 100µm

Ich untersuchte anschließend die Ko-Expression von Parvalbumin (PV), Calbindin (Cb), Calretinin (Cr), Somatostatin (Sst), Pro-Cholecystokin (Pro-CCK) und ErbB4 in Interneuronen (Abb. 3.5-7). Die Diversität der ErbB4+ Interneurone im medialen präfrontalen Kortex von Wildtyp Mäusen war vielfältig. Annähernd 50% der ErbB4+ Interneurone ko-exprimierte PV, einen Marker für Chandelier- und Korbzellen. Knapp 30% der ErbB4+ Zellen im präfrontalen Kortex ko-exprimierten Calbindin. Ein Teil der Pyramidenzellen exprimierten ebenfalls Calbindin, deshalb ermittelte ich den Anteil ErbB4- und Calbindin-exprimierender Interneurone nicht (Hayes und Lewis, 1992). Calbindin+ Interneurone unterscheiden sich von Calbindin+ Pyramidenzellen durch höhere Färbungsintensität und Calbindin-positive Neuriten (Abb. 3.7, DeFelipe, 1997). Ich beobachtete eine hohe ErbB4-Intensität in Calbindin+/ErbB4+ Interneuronen (Abb. 3.7). Calretinin+ und Somatostatin+ Interneurone exprimierten ErbB4 nur schwach und bildeten mit 15% und 9% einen geringeren Anteil an der ErbB4-Population. Nur 1% der ErbB4+ Zellen waren positiv für das Neuropeptid Pro-CCK (Abb. 3.5C; 3.7). Fast alle PV+ Interneurone im präfrontalen Kortex exprimierten ErbB4 (96%), 42% der Calretinin+ Zellen waren ErbB4+, und 19% der Somatostatin+ Zellen ko-exprimierten ErbB4 (Abb. 3.5D; 3.6). Der Anteil der PV, Somatostatin, Calbindin und Calretinin ko-exprimierenden ErbB4+ Interneurone des präfrontalen Kortex war in den *Nrg3*^{-/-} mutanten Mäusen nicht signifikant verändert.

Zur Analyse der Interneurone im primären somatosensorischen Kortex untersuchte ich jeweils eine Säule der kortikalen Schicht I bis VI. Im somatosensorischen Kortex ko-exprimierte ein größerer Anteil der ErbB4+ Zellen PV (70%) und ein kleiner Anteil der ErbB4+ Neurone war positiv für Calbindin, Calretinin, Somatostatin und Pro-CCK (Cb: 5%; Cr: 9%; Sst: 5%; Pro-CCK: 2%, Abb. 3.5E und 3.6-7). Ich beobachtete, dass im somatosensorischen und präfrontalen Kortex eine ähnliche Proportion der verschiedenen Interneuronen-Typen ErbB4 ko-exprimierten (Abb. 3.5 D, F). Ähnliche Proportionen von ErbB4-positiven Zellen ko-exprimierten die verschiedenen Interneuronenmarker im primären somatosensorischen Kortex der *Nrg3*^{-/-} Mutanten und Wildtyp Mäuse.

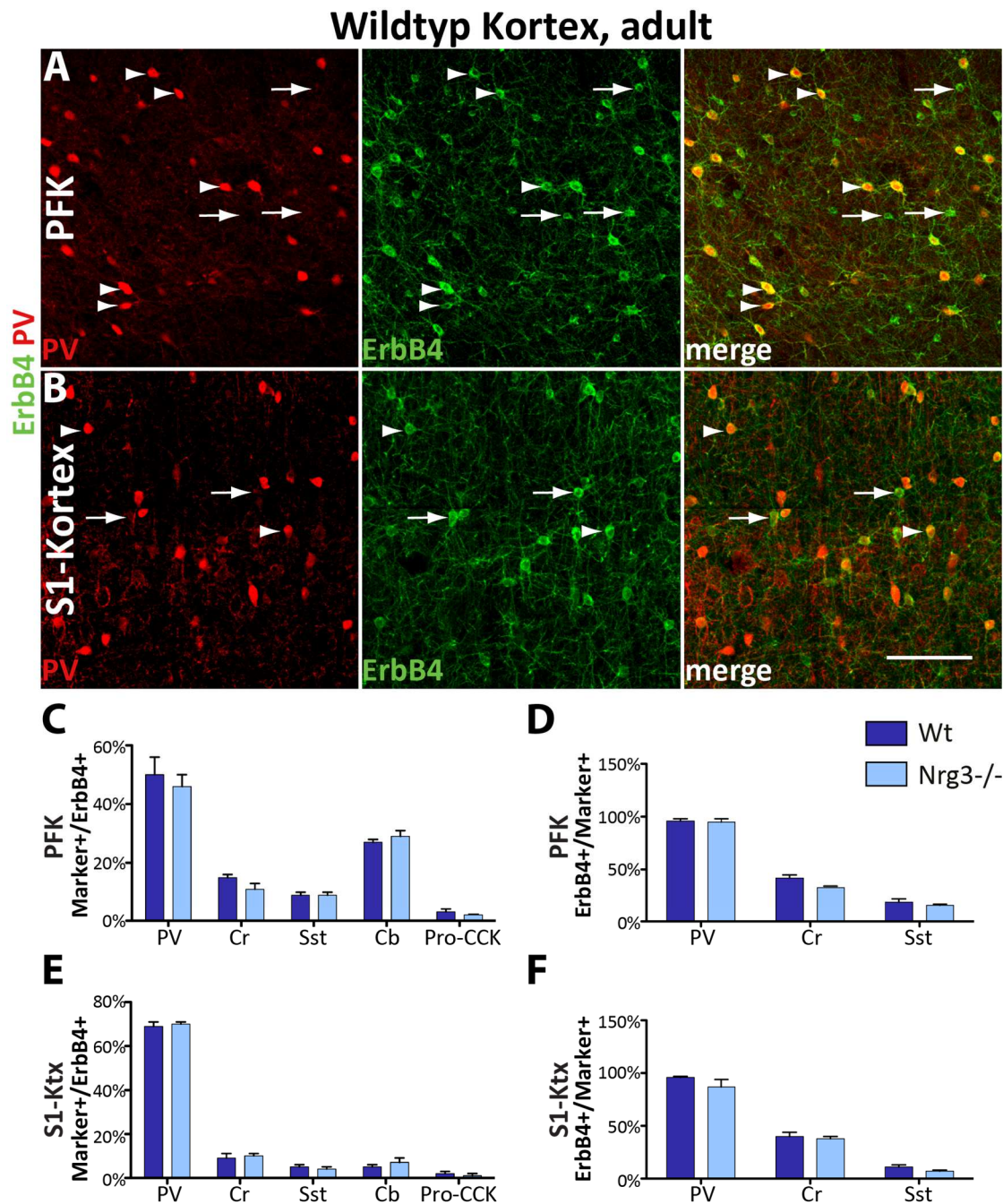


Abbildung 3.5 Die Identität der ErbB4+ Interneurone im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex von *Nrg3*^{-/-} Mäusen ist unverändert

Analyse der ErbB4, PV, Cr, Sst, Cb und Pro-CCK exprimierenden Interneuronenpopulationen im Kortex adulter *Nrg3*^{-/-} und Wildtyp Mäuse. **A, B**) Immunfluoreszenzbilder der ErbB4 und PV Ko-Expression im PFK und S1-Kortex einer Wildtyp Maus. **C, E**) Anteile der verschiedenen Interneuronenpopulationen an der ErbB4-Population: PV+ Zellen bildeten mindestens 50%, Cb+ Interneurone bildeten im PFK einen Anteil von 30%. **D, F**) Anteile der ErbB4+ Interneurone an den PV-, Cr- und Sst- Populationen. Fast alle PV+ ko-exprimierten ErbB4. Ca. 40% der Cr+ ko-exprimierten ErbB4. (PFK: präfrontaler Kortex; S1- Ktx: primärer somatosensorischer Kortex; PV: Parvalbumin, Cr: Calretinin, Sst: Somatostatin, Cb: Calbindin, CCK: Cholecystinin; SEM angegeben, n= 3 Tiere pro Gruppe)

Maßstab: 100µm

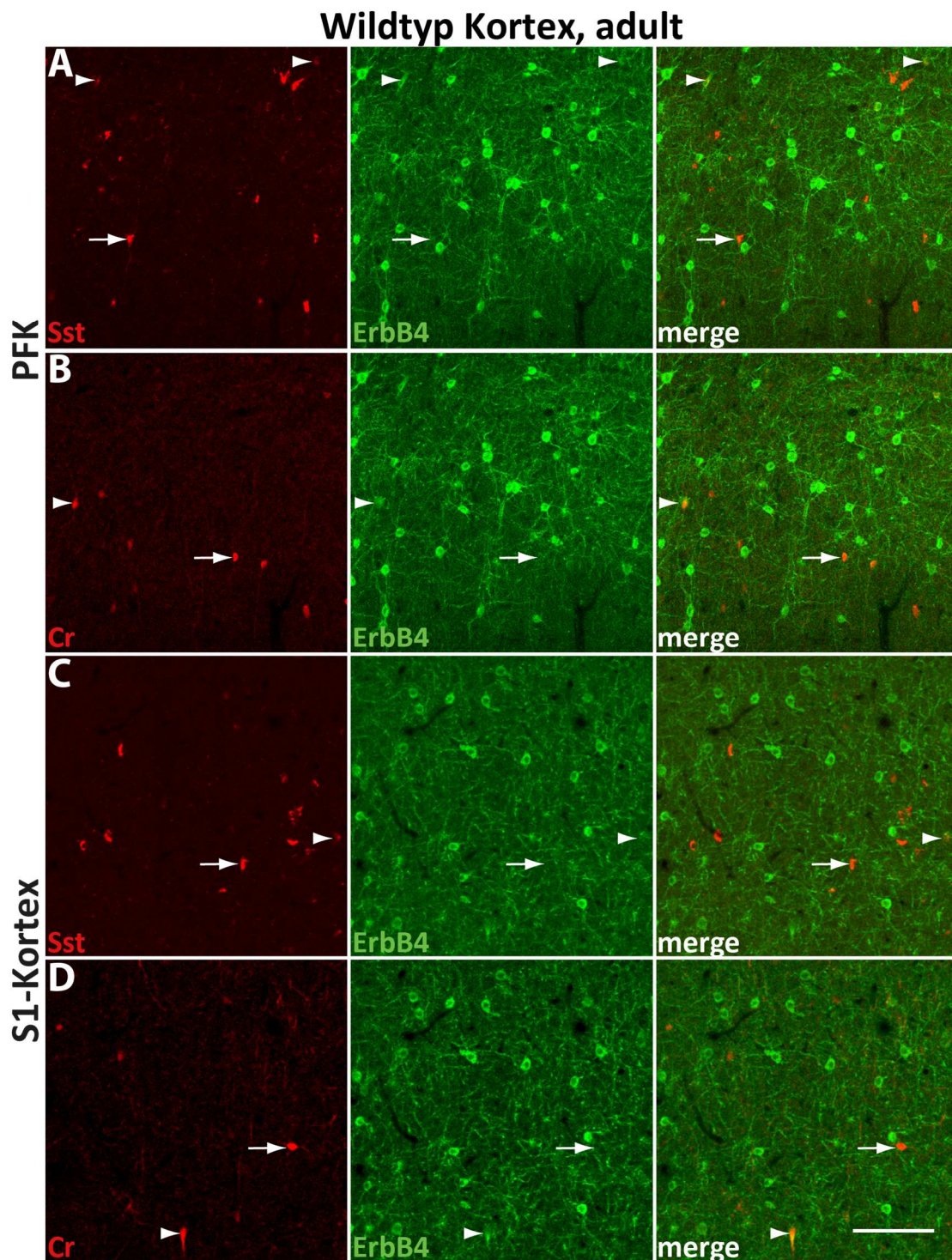


Abbildung 3.6 Die Sst+ und Cr+ Interneurone bilden einen geringen Anteil an der ErbB4-Population im präfrontalen Kortex und im primären somatosensorischen Kortex

Identifikation der ErbB4+ Interneurone im Kortex adulter Mäuse mittels Analyse der Proteine ErbB4, Cr und Sst. Die Populationen der Cr+ und Sst+ Interneurone ko-exprimierten nur selten und nur eine geringe Menge ErbB4. Immunfluoreszenzbilder vom präfrontalen (A,B) und vom primären somatosensorischen Kortex (C,D) einer Wildtyp Maus. (Pfeilspitzen: Ko-Expression mit ErbB4, Pfeile: Zellen, die nur Sst/Cr exprimieren, PFK: präfrontaler Kortex; S1- Kortex: primärer somatosensorischer Kortex) Maßstab: 100µm

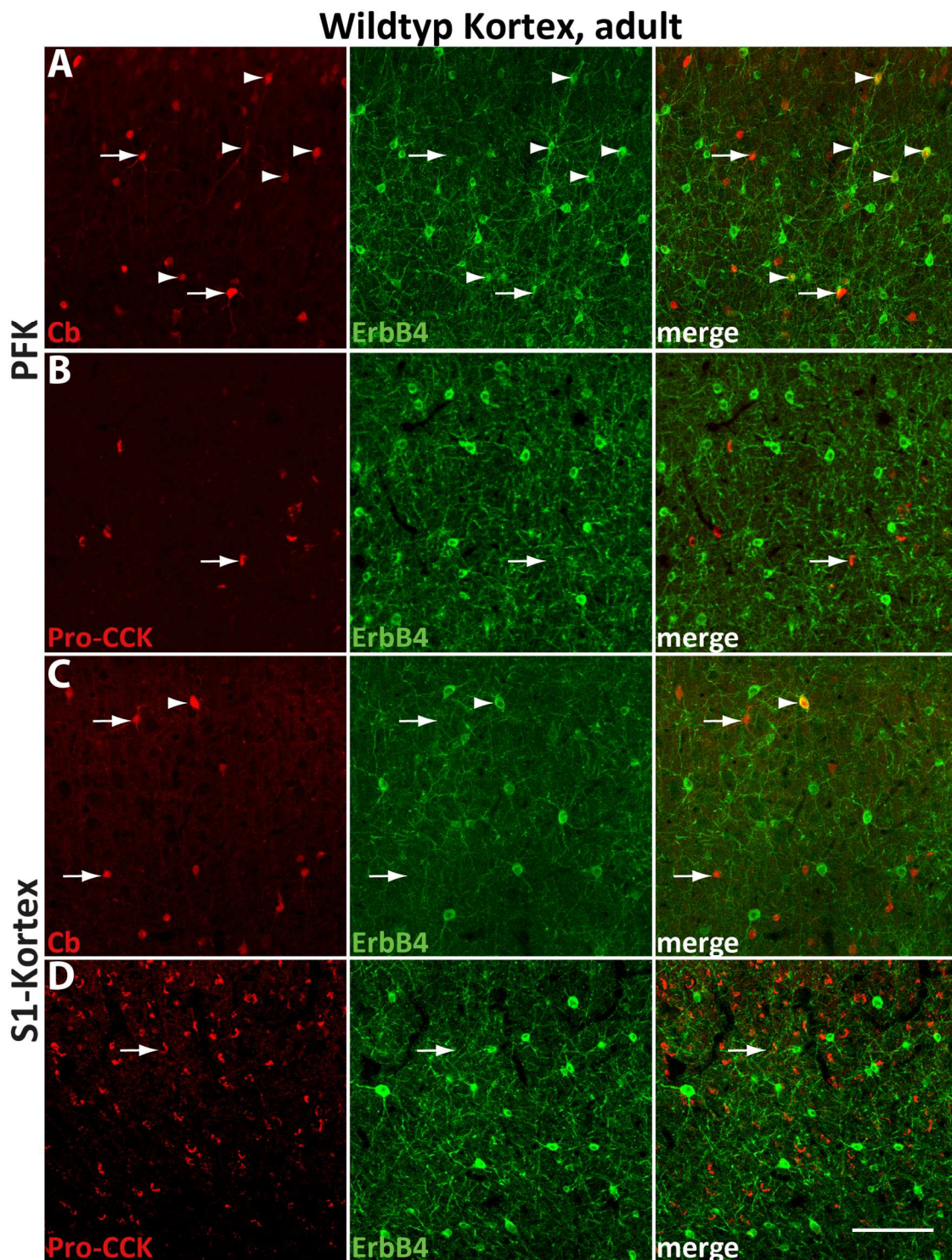


Abbildung 3.7 Die Cb+ und ErbB4+ Interneuronenpopulationen überlappen im präfrontalen Kortex stärker als im primären somatosensorischen Kortex

Identifikation der ErbB4+ Interneurone des Kortex adulter Mäuse durch Betrachtung der Proteine ErbB4, Cb und Pro-CCK einer adulten Wildtyp Maus. **A,C)** Immunfluoreszenzbilder der Proteine Cb und ErbB4. Cb+ Interneurone bildeten einen großen Anteil der ErbB4-Population des PFK, nicht aber des S1-Kortex. **B,D)** Immunfluoreszenzbilder der Pro-CCK/ErbB4-Färbung. Für Pro-CCK und ErbB4 konnte fast keine Ko-Expression im Kortex beobachtet werden. (Pfeilspitzen: Ko-Expression mit ErbB4, Pfeile: Zellen, die nur Cb/Pro-

CCK exprimierten; PFK: präfrontaler Kortex; S1- Ktx: primärer somatosensorischer Kortex; Cb: Calbindin, Pro-CCK: Pro-Cholecystokinin)
Maßstab: 100µm

Die Diversität der Interneurone im Hippocampus war wesentlich größer, auch die Intensität der ErbB4-Expression und Größe der ErbB4+ Interneurone variiert stärker als im somatosensorischen und präfrontalen Kortex (Abb. 3.8A). Ich analysierte die Regionen CA1, CA3, den Gyrus Dentatus und deren Subregionen mit den Interneuronenmarkern ErbB4, PV, nNos und Pro-CCK. Die Dichte der ErbB4+Interneurone des Hippocampus von Wildtyp und *Nrg3*-mutanten Mäusen ist in Abb. 3.8 dargestellt. Ich konnte keine Ko-Expression von Pro-CCK und ErbB4 im Hippocampus beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Dichte der ErbB4+ Zellen sowie der PV- und nNos-exprimierenden Interneurone war im Großteil der Regionen der *Nrg3*^{-/-} Mutanten unverändert (Abb. 3.8). Eine Reduktion der ErbB4+ Interneurone konnte ich im CA1-Stratum oriens feststellen, die auf eine Reduktion der ErbB4+/PV+ Population zurückzuführen war (Abb. 3.8C). Zusätzlich war im CA1 Stratum lacunosum-moleculare eine Reduktion von ErbB4+/nNos+ Zellen in der *Nrg3*^{-/-} Mutante zu verzeichnen. Diese Differenz wies jedoch einen hohen Fehler auf (5%), und war wegen der schwachen ErbB4-Färbung der Neurone in diesen Regionen schwierig zu analysieren (Abb. 3.8D).

Zusammenfassend konnte ich in adulten *Nrg3*-Mutanten keine wesentliche Veränderung in der Anzahl, Lokalisation und Identität der ErbB4+ Interneurone im präfrontalen, primären somatosensorischen Kortex und im Großteil des Hippocampus beobachten. Die einzige Region, in der ich eine Veränderung beobachtete, war das CA1 Stratum oriens. Da diese Region sehr klein ist und eine geringe Anzahl von Interneuronen enthält muss dieser Befund überprüft und erhärtet werden.

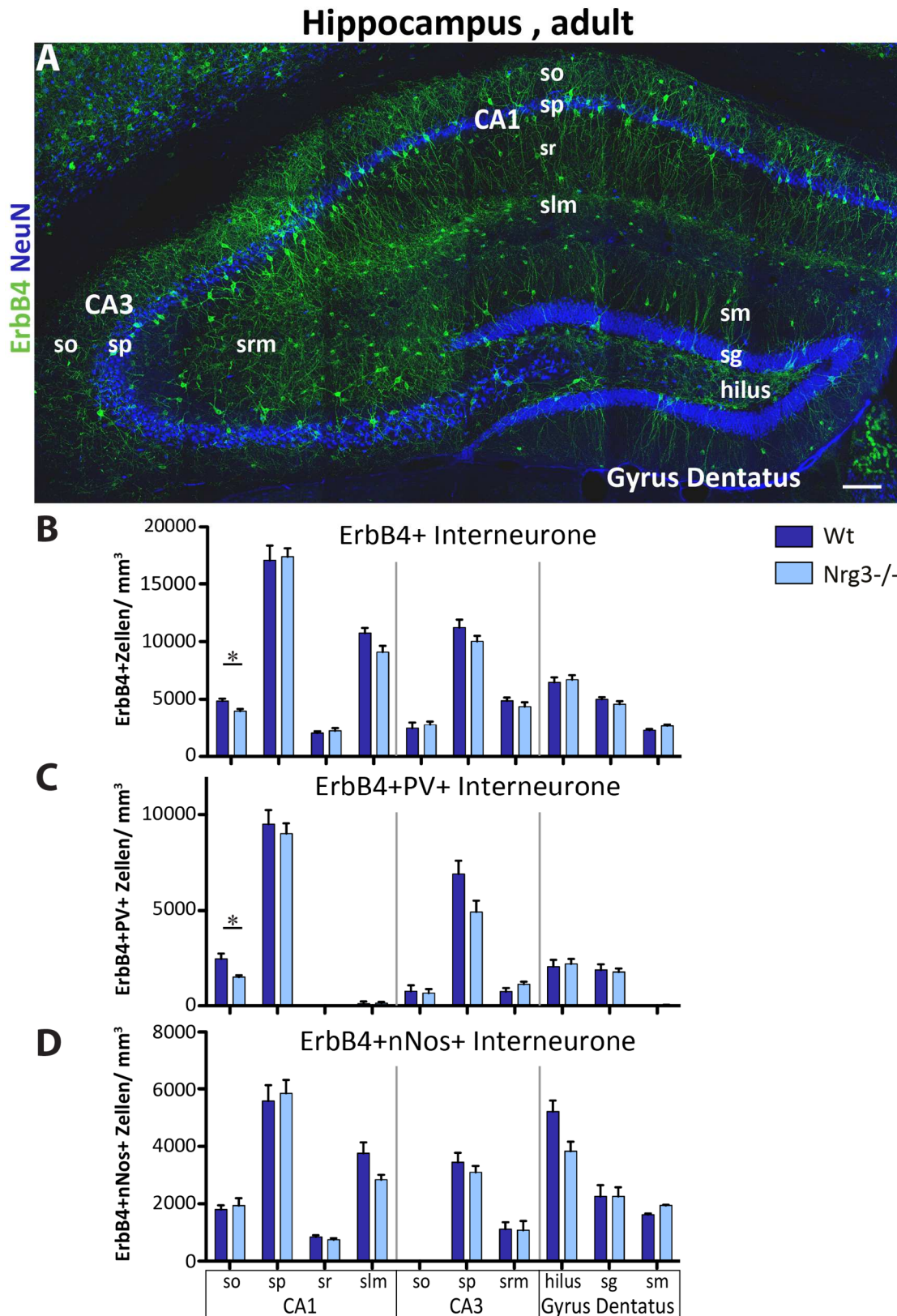


Abbildung 3.8 Die Dichte der ErbB4+ Interneurone im Hippocampus von *Nrg3^{-/-}* Mäusen ist weitgehend unverändert

Abbildung 3.8 Die Dichte der ErbB4+ Interneurone im Hippocampus von *Nrg3*^{-/-} Mäusen ist weitgehend unverändert

Charakterisierung der ErbB4+ Interneurone des Hippocampus von adulten Mäusen durch Betrachtung der Proteine ErbB4, PV, nNos und NeuN. **A)** Fluoreszenzbild des Hippocampus einer adulten Wildtyp Maus mit Kennzeichnung der hippokampalen Regionen; **B)** Die Analyse zeigte, dass die Verteilung und Dichte der ErbB4-Population von *Nrg3*^{-/-} Mäusen im Allgemeinen unverändert war. Nur im CA1 Stratum oriens (CA1-so) war die Dichte der ErbB4+ Interneurone signifikant reduziert. **C,D)** Die Quantifizierung der PV und nNos Ko-Expression mit ErbB4 zeigte, dass die Reduktion im CA1-so auf ErbB4+PV+ Interneurone zurückzuführen war. Die Dichte der ErbB4+/nNos+ Interneurone blieb unverändert. Die Identität der PV+ und nNos+ Interneurone war in der *Nrg3*-Mutante in den übrigen Regionen nicht verändert. (CA: Cornu Ammonis; so: Stratum oriens; sp: Stratum pyramidale, slm: Stratum lacunosum und Stratum moleculare; srm: Stratum radiatum und slm im CA3; sg: Stratum granulosum, nNos: „neuronal nitric oxide synthase“, PV: Parvalbumin; SEM angegeben, n= 6 Tiere pro Gruppe)

Maßstab: 200µm

3.2 Nrg1 und Nrg3 fördern die exzitatorische Synaptogenese in Interneuronen

3.2.1 Identifikation von ErbB4-positiven Interneuronen in Kultur

Um in Zellkultur die Expression von ErbB4 in GABAergen Interneuronen zu analysieren, isolierte ich kortikale Zellen aus *GAD67^{GFP}* Mäusen vom postnatalen Tag 1 (P1). Die Zellen wurden 7 und 14 Tage kultiviert und anschließend mit Antikörpern gegen GFP und ErbB4 angefärbt (Abb. 3.9A).

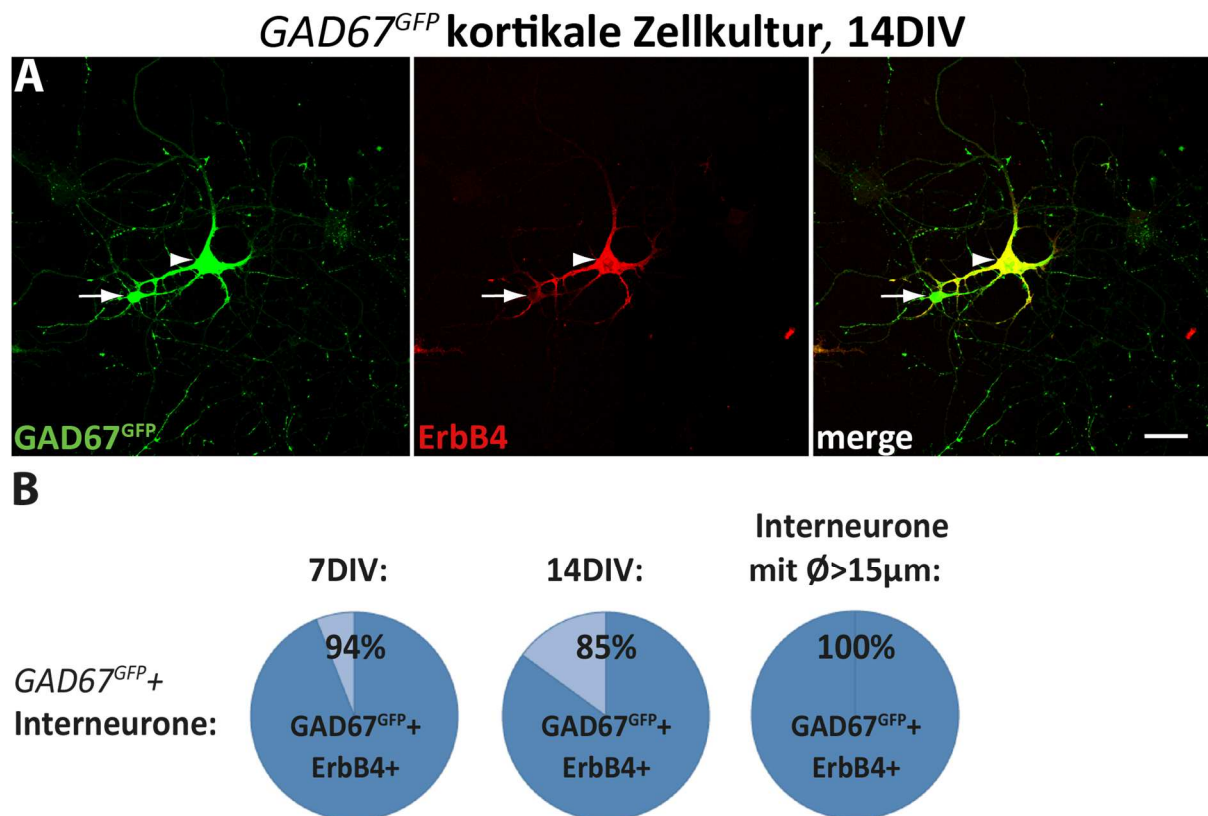


Abbildung 3.9 ErbB4+ Interneurone können in Kultur durch Ko-Expression von *GAD⁶⁷*, Größe und Form identifiziert werden

Die Analyse von ErbB4+ Interneuronen in kortikalen Kulturen von *GAD67^{GFP}*-knock-in-Mäusen durch Betrachtung der ErbB4- und GFP-Expression zeigte, dass 94% der GFP+ Interneurone nach 7 Tagen und 85% nach 14 Tagen in Kultur ErbB4 ko-exprimierten. Eine weitere Eingrenzung durch die Zellgröße zeigte, dass 100% der *GAD67^{GFP}* Interneurone mit einem Durchmesser $> 15\mu\text{m}$ ErbB4+ sind. **A)** Immunfluoreszenzfärbung einer kortikalen Zellkultur aus *GAD67^{GFP}*-knock-in-Mäusen für ErbB4 (rot) und GFP (grün), 14 DIV; **B)** Quantifizierung der ErbB4-GFP-Koexpression (GAD67: Glutamat Decarboxylase mit dem MW 67, GFP: grün fluoreszierendes Protein, DIV: Days in vitro)

Maßstab: 50 μm

Die Analyse zeigte, dass nach 7 Tagen Kultur 94% der GFP+ Zellen ErbB4 exprimierten. In vivo ist die Intensität der ErbB4-Expression in Interneuronen im Kortex höher in neugeborenen als in adulten Mäusen (Yau et al., 2003). Auch in vitro beobachtete ich eine Reduktion der ErbB4-Expression nach 14-tägiger Kultur, d.h. nur noch 85% der GFP+ Zellen waren auch ErbB4+ (Abb. 3.9). ErbB4-exprimierende Interneurone waren in älteren Kulturen zusätzlich durch ihre Zellgröße und Dendritenverzweigung klar von ErbB4-negativen Interneuronen unterscheidbar. Alle GAD67^{GFP+} Zellen, die eine Somagröße >15 µm und wenigstens drei Dendriten aufwiesen, exprimierten ErbB4 (Abb. 3.9). Deshalb analysierte ich im Weiteren nur Zellen, die diesen morphologischen Kriterien entsprachen.

3.2.2 Lokalisation des Nrg3-Proteins

Zur Lokalisation des Nrg3 Proteins in kortikalen Zellen etablierte ich Primärkulturen von kortikalen Zellen aus neugeborenen Mäusen und Immunhistologie gegen Nrg3. Der eingesetzte Antikörper (Neuromics) erkennt die EGF-Domäne von Nrg3. Diese Domäne bindet an den Neuregulin-Rezeptor ErbB4 (Zhang et al., 1997).

Die Zellen wurden nach 17 Tagen in Kultur mit Antikörpern gegen Nrg3, ErbB4 und MAP2 angefärbt (Abb. 3.10). Ich beobachtete Nrg3 auf ErbB4+ Interneuronen, aber nicht auf anderen kortikalen Nervenzellen (Abb. 3.10A). Interessanterweise war Nrg3 punktförmig auf Dendriten angereichert, und ko-lokalisierte dann mit ErbB4. In Nrg3-mutatnten Ko-Kulturen von Neuronen und Astrozyten konnte ich kein Signal beobachten (Abb. 3.10A). In diesem Experiment konnte nicht spezifiziert werden, welche Zellen Nrg3 exprimierten. Die EGF Domäne von Nrg3 könnte entweder auf der Oberfläche von Interneuronen gebunden oder als membranständiges Protein vorhanden sein.

Kortikale Zellkultur, 17DIV

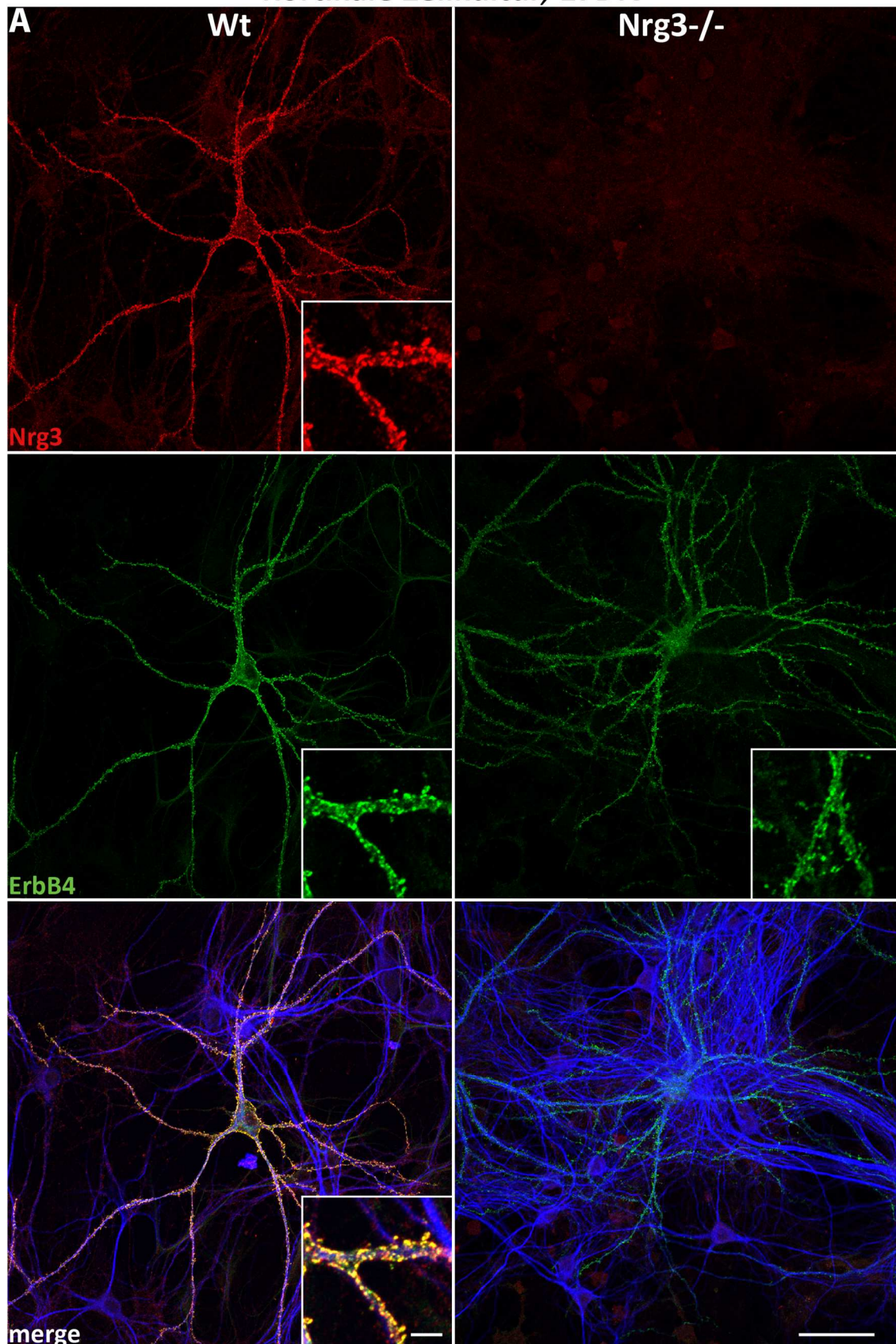


Abbildung 3.10 Nrg3 ist auf Dendriten von ErbB4+ Interneuronen lokalisiert

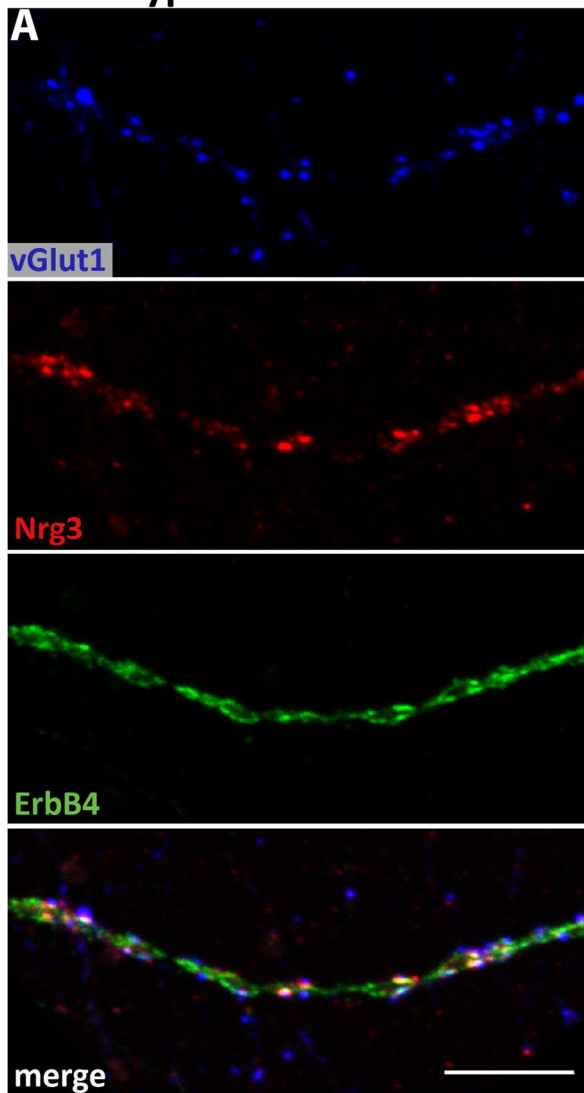
Abbildung 3.10 Nrg3 ist auf Dendriten von ErbB4+ Interneuronen lokalisiert

Analyse der Nrg3-Expression in kortikalen Zellkulturen von neugeborenen Wildtyp Mäusen und *Nrg3*^{-/-} Mutanten. Der Antikörper erkennt die lösliche Domäne des Proteins, deshalb ist die Erscheinung der Immunfärbung nicht gleichbedeutend mit der produzierenden Zelle. **A)** Fluoreszenzfärbung der Proteine ErbB4, Nrg3 und MAP2 (neuronales Markerprotein für Dendriten) einer Neuronen/Astrozyten Ko-Kultur. Nrg3 war auf ErbB4-exprimierenden Interneuronen, aber nicht auf anderen MAP2+ Nervenzellen lokalisiert. Zusätzlich war Nrg3 und ErbB4 spezifisch in Dendriten und nicht in Axonen lokalisiert. Das Nrg3-Signal war spezifisch, da keine Expression in *Nrg3*^{-/-} Kulturen beobachtet werden konnte. (MAP2: Microtubuli associated protein, DIV: days in vitro)
Maßstab A: 100µm; Maßstab Vergrößerung A: 10µm

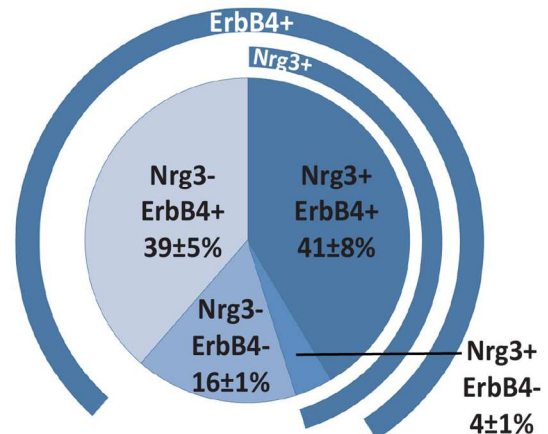
3.2.3 Nrg3 ko-lokalisiert mit exzitatorischen Synapsen

Um die Lokalisation von Nrg3 auf ErbB4+ Interneuronen zu untersuchen, kultivierte ich kortikale Zellen von Kontrollmäusen und *Nrg3*-Mutanten für 17 Tage. Durch Immunzytologie konnte ich beobachten, dass das Nrg3 auf den Dendriten von ErbB4-positiven Interneuronen vorhanden war; der größte Anteil von Nrg3 war in Puncta lokalisiert. In mehr als 80% dieser Nrg3-positiven Puncta konnte ich auch ErbB4 nachweisen (Abb. 3.11C). Etwa 35% der Nrg3-positiven Puncta war auch vGlut1-positiv, einem Marker für glutamaterge exzitatorische präsynaptische Puncta (Abb. 3.11C). 82% der Nrg3+ und 80% der vGlut1+ Puncta waren auch ErbB4-positiv; in etwa der Hälfte ErbB4+/vGlut1+ Puncta konnte ich zusätzlich Nrg3 nachweisen (Abb. 3.11B). Diese Beobachtungen legen die Hypothese nahe, dass Nrg3/ErbB4-Signale in glutamatergen Synapsen auf Interneuronen eine Funktion ausüben.

Wildtyp kortikale Zellkultur



B Menge der vGlut1+ Puncta



C Menge der Nrg3+ Puncta

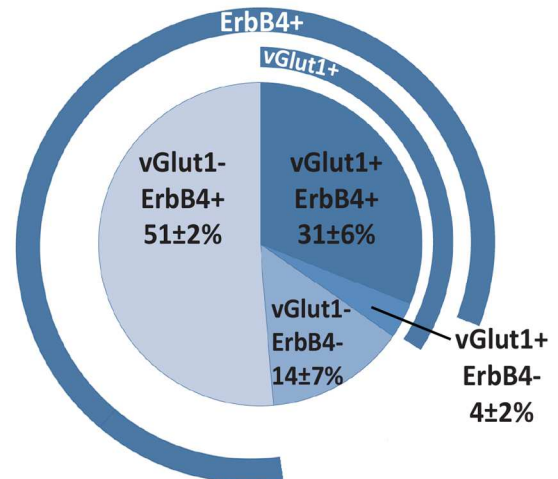


Abbildung 3.11 Nrg3 ko-lokalisiert mit ErbB4 und exzitatorischen Synapsen auf Interneuronen

Analyse der Ko-Lokalisation von Nrg3 mit den Proteinen ErbB4 und vGlut1 auf Interneuronen in Zellkulturen von Wildtyp Mäusen. **A)** Immunfluoreszenzbild eines Dendriten; **B)** Die Quantifizierung zeigte, dass Nrg3 mit 45% der präsynaptischen vGlut1+ Puncta auf Interneuronen ko-lokalisierte. 80% der vGlut1+ Puncta ko-lokalisierten mit ErbB4-dichten Strukturen. **C)** Über 80% der Nrg3+ Puncta befanden sich in ErbB4-dichten Strukturen. Etwa 31% der Nrg3+ Puncta ko-lokalisierten mit vGlut1 und ErbB4. (SEM angegeben; n=2 Tiere; N=23 Zellen)

Maßstab: 10µm

3.2.4 Exogenes Nrg1 fördert postsynaptisches PSD-95 in Interneuronen

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Nrg1/ErbB4-Signale die Synaptogenese, synaptische Plastizität und die Entwicklung des Dendritenbaums modulieren (Buonanno und Fischbach, 2001; Fazzari et al., 2010; Ting et al., 2011). In kultivierten kortikalen GABAergen Neuronen erhöhte exogenes Nrg1 die Anzahl von PSD-95-positiven („post synaptic density protein 95“) Puncta auf deren Dendritenoberfläche und führte zu einer stärkeren Verzweigung ihres Dendritenbaums (Ting et al., 2011). Dieser Effekt konnte durch die Zugabe der löslichen extrazellulären Domäne von ErbB4 verhindert werden; diese Domäne bindet und neutralisiert endogenes Neuregulin (Ting et al., 2011). Ich untersuchte den Effekt von exogenem Nrg1 in kortikalen Zellkulturen von *ErbB4*^{+/-} und *ErbB4*^{-/-} Mäusen; diese Tiere trugen zusätzlich ein *GAD67*^{GFP} Allel, das die Identifizierung der Interneurone erlaubte. Ich analysierte Kulturen mit geringer Zelldichte (<3x10⁴ Zellen/1,91cm²). Um die Variabilität zwischen verschiedenen Kulturen auszuschließen, mischte ich Zellen von *ErbB4*^{+/-} und *ErbB4*^{-/-} Mäusen und analysierte die PSD-95-Expression auf ErbB4-positiven und ErbB4-negativen (d.h. *ErbB4*-mutanten) Interneuronen (Abb.3.12A). Ausgezählt wurden *Gad67*^{GFP}-positive Interneurone mit großem Soma und mehr als drei primären Dendriten, da diese Interneurone in Wildtyp Kulturen in vorherigen Experimenten alle ErbB4 exprimierten (Abb. 3.9). Bereits ohne Zusatz von exogenem Nrg1 zeigten ErbB4-positive Interneurone eine größere Anzahl von PSD-95+ Puncta als ErbB4-negative Interneurone, diese Differenz konnte ich auch in Kulturen höherer Dichte beobachten (<6x10⁴ Zellen/1,91cm²; Abb. 3.12B,C). Zusätzlich konnte ich in Kulturen geringer Dichte beobachten, dass die Zugabe von exogenem Nrg1 die Anzahl der PSD-95+ Puncta in ErbB4+, aber nicht in ErbB4- Interneuronen weiter erhöhte (Abb. 3.12C). Nicht alle PSD-95+ Strukturen waren vGlut1+, d.h. entsprachen glutamatergen Synapsen. Ich bestimmte deshalb die Anzahl von PSD-95+/vGlut1+ auf *GAD67*^{GFP}-positiven Interneuronen, die ErbB4+ und ErbB4- waren. Exogenes Nrg1 hatte eine ähnliche Wirkung auf die Ausbildung von PSD-95+/vGlut1+ Puncta (Abb. 3.12C). Nrg1 förderte also die Akkumulation prä- und post-synaptischer Proteine. Da dies nur auf ErbB4-positiven, aber nicht auf ErbB4-negativen Neuronen beobachtet wurde, wird dieser Effekt direkt durch Nrg1/ErbB4 vermittelt.

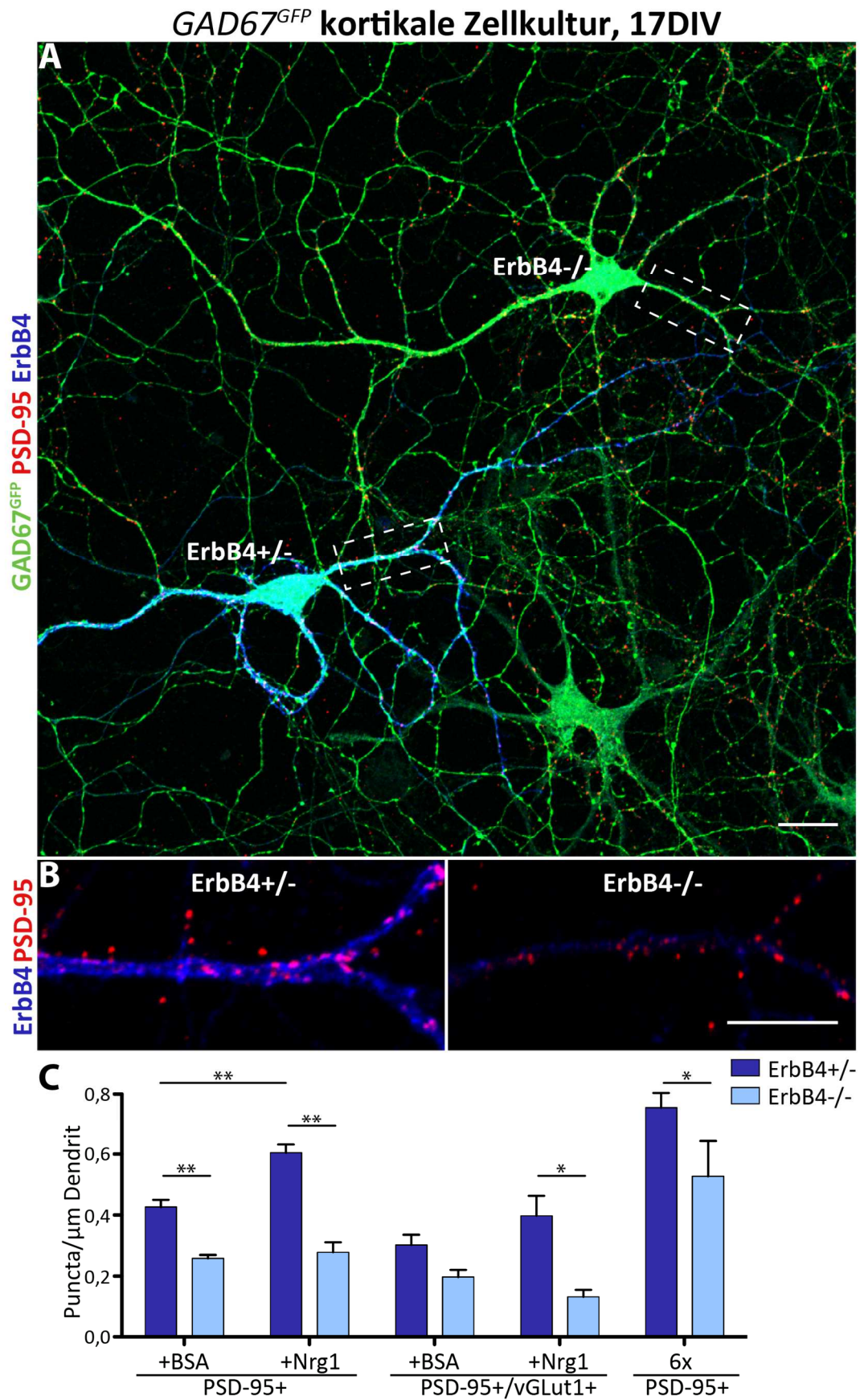


Abbildung 3.12 Nrg1 erhöht die Anzahl der PSD-95+ Puncta in Interneuronen ErbB4-abhängig

Abbildung 3.12 Nrg1 erhöht die Anzahl der PSD-95+ Puncta in Interneuronen ErbB4-abhängig

Analyse der PSD-95-, vGlut1- ErbB4- und GFP-Expression gemischter kortikaler *ErbB4^{+/-}* und *ErbB4^{-/-}* Zellkulturen. Nrg1 erhöhte die Anzahl der glutamatergen Synapsen (PSD-95+/vGlut1+) sowie die Gesamtzahl PSD-95+ Puncta in *ErbB4^{+/-}* Interneuronen. **A)** Fluoreszenzbild von *ErbB4^{+/-}* und *ErbB4^{-/-}* Interneuronen in gemischter Kultur **B)** Der Dendrit des *ErbB4^{-/-}* Interneurons (rechts) hat weniger PSD-95+ Puncta als ein heterozygoten Interneuron (links) **C)** Die Quantifizierung bestätigte, dass *ErbB4^{-/-}* Interneurone weniger PSD-95+ Puncta und Synapsen besaßen. Die Zugabe von Nrg1 hatte selektiv eine Wirkung auf die Anzahl der PSD-95-Puncta in heterozygoten Interneuronen. *ErbB4^{-/-}* Zellkulturen mit zweifach erhöhter Dichte (6x) wiesen ebenfalls eine reduzierte Anzahl von PSD-95 Puncta in Interneuronen auf. (SEM angezeigt; n= 7 Tiere; N= 216 Zellen; DIV: „days in vitro“; 6x: 6x 10⁴ Zellen pro 1,9cm² Well)

Maßstab A: 20µm

Maßstab B: 10µm

3.2.5 Die Funktion von Nrg3 in der Genese exzitatorischer Synapsen

Um zu analysieren, ob die Bildung glutamaterger Synapsen auch durch Nrg3 moduliert wird, stellte ich Kulturen mit geringer Zelldichte (<3x10⁴ Zellen/1,91cm²) aus *Nrg3^{-/-}* und *Nrg3^{+/-}* Mäusen her. Diese kortikalen Zellen wurden mit Antikörpern gegen ErbB4, PSD-95 und vGlut1 gefärbt (Abb. 3.13A,B). Kulturen geringer Dichte aus *Nrg3^{-/-}* Mäusen zeigten signifikant weniger PSD-95+ Puncta auf ErbB4+ Interneuronen als die Kulturen aus *Nrg3^{+/-}* Mäusen (Abb. 3.13C). Die Größe der PSD-95+ Puncta in Kulturen aus *Nrg3^{-/-}* Mäusen war darüberhinaus reduziert, die Intensität der Färbung unterschied sich aber nur gering (Abb. 3.13D,E). Das bedeutet, dass die Puncta von *Nrg3^{-/-}* Interneuronen weniger PSD-95 enthielten. Diese Ergebnisse wurden allerdings nur in Kulturen geringer Dichte beobachtet. Wurden die kortikalen Zellen in höherer Dichte (<6x10⁴ Zellen/1,91cm²) ausgesät, war die Differenz der PSD95+ Puncta gering (Abb. 3.13C-E).

Ich analysierte zusätzlich PSD-95+/vGlut1+ und PSD95+/vGlut1- Puncta auf Interneuronen von Kontroll und *Nrg3*-mutanten Kulturen geringer Dichte. Die Zahl der PSD-95+/vGlut1+ und der PSD95+/vGlut1- Puncta auf den Dendriten war in den *Nrg3^{-/-}* Kulturen reduziert, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Unabhängig vom Genotyp enthielten PSD-95-Puncta, die mit vGlut1 ko-lokalisieren, mehr PSD-95-Protein (Abb. 3.14C,D). In der Abwesenheit von Nrg3 war die Intensität der PSD-95-Immunreaktivität und deren Größe in allen PSD-95+ Puncta reduziert (Abb. 3.14C,D). Die Scholl Analyse zeigte keinen Effekt von Nrg3 auf die Entwicklung des Dendritenbaums (Daten nicht gezeigt).

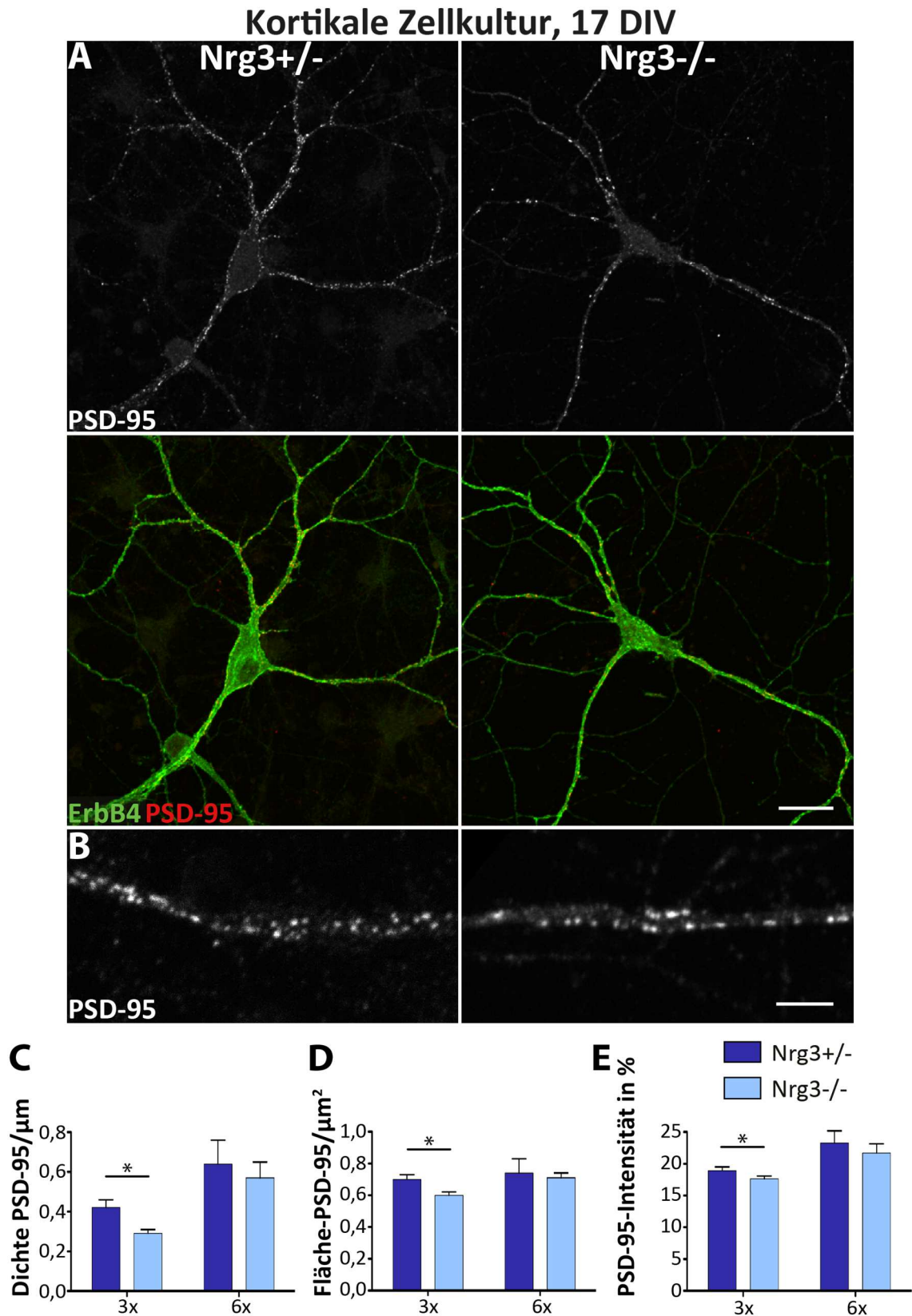


Abbildung 3.13 Die Anzahl, Fläche und Intensität von PSD-95+ Puncta auf ErbB4+ Interneuronen ist in *Nrg3*^{-/-} Kulturen reduziert

Abbildung 3.13 Die Anzahl, Fläche und Intensität von PSD-95+ Puncta auf ErbB4+ Interneuronen ist in *Nrg3*^{-/-} Kulturen reduziert

Analyse der PSD-95-Puncta auf ErbB4+ Interneuronen in kortikalen Zellkulturen von *Nrg3*^{+/-} und *Nrg3*^{-/-} Mäusen mit unterschiedlicher Dichte. Sowohl die Anzahl als auch die Größe von PSD-95+ Strukturen der Dendriten von *Nrg3*^{-/-} Interneuronen waren reduziert, wenn sie in geringer Dichte (3x) kultiviert wurden. Wurden kortikale Zellen in höherer Dichte (6x) kultiviert, unterschieden sich diese Parameter nicht. **A)** Immunfluoreszenzbilder der ErbB4-, PSD-95-Expression von kortikalen Neuronenkulturen. **B)** Höhere Auflösung der PSD-95-Puncta eines Dendriten; **C,D)** Die Quantifizierung zeigte, dass Anzahl (C) und Größe (D) der PSD-95-Puncta der *Nrg3*^{-/-} Interneurone in Zellkulturen mit geringer Dichte signifikant reduziert waren. **E)** Die Intensität der PSD-95-Färbung der PSD-95+ Puncta war in *Nrg3*^{-/-} Kulturen mit geringer Dichte gering reduziert. (Einheit Intensität: Anteil vom Maximum=100%; SEM angegeben, n=5 Tiere pro Gruppe; N=282 Zellen; *=p<0,05; 3x/6x: 3x oder 6x 10⁴ Zellen pro 1,9cm² Well)

Maßstab A: 20µm

Maßstab B: 10µm

Kortikale Zellkultur, 17 DIV

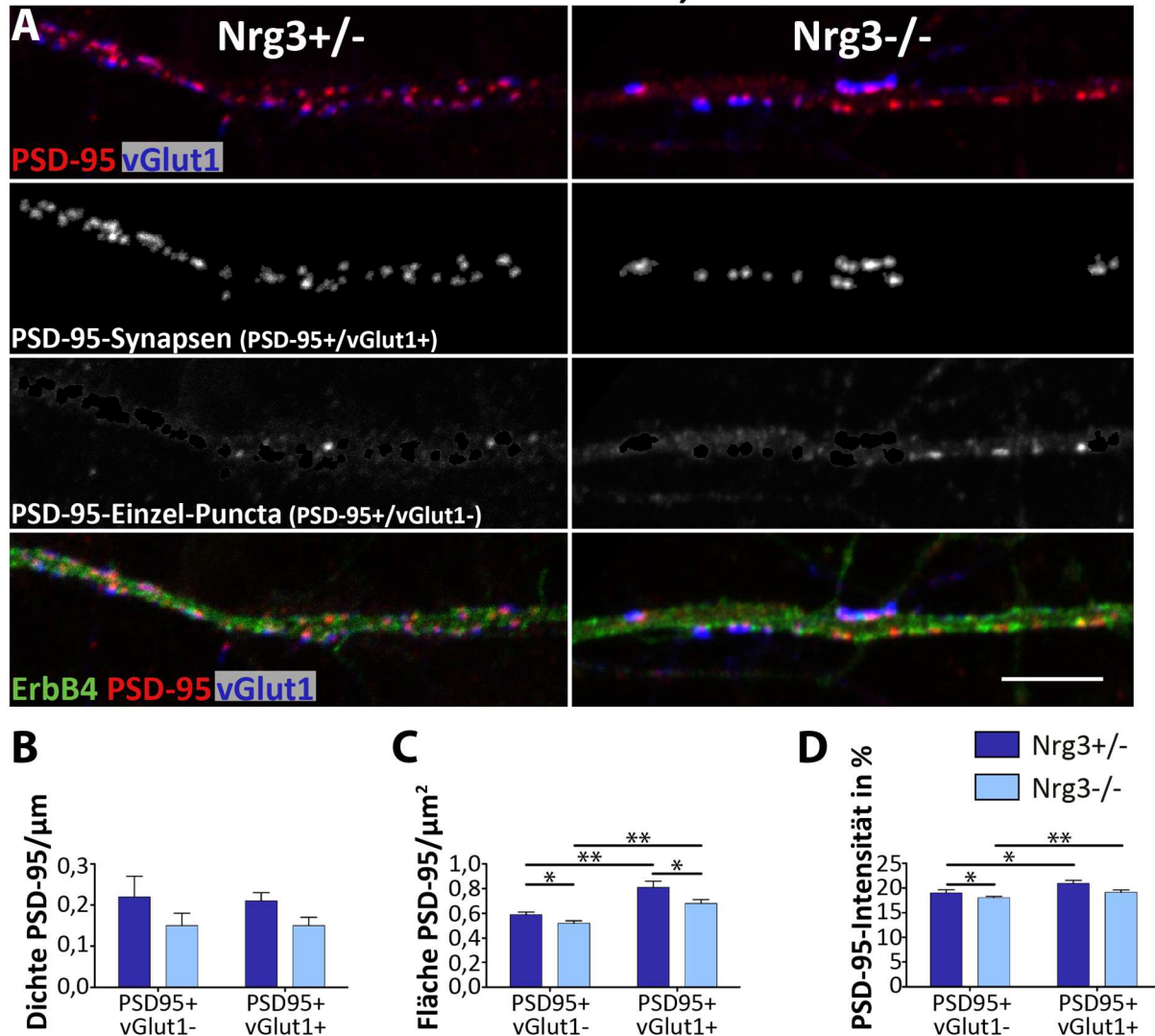


Abbildung 3.14 Glutamaterge Synapsen auf ErbB4+ Interneuronen von *Nrg3*^{-/-} Mäusen enthalten weniger PSD-95

Analyse glutamaterger Synapsen kortikaler *Nrg3*^{+/-} und *Nrg3*^{-/-} Kulturen durch Betrachtung von ErbB4, des postsynaptischen Proteins PSD-95 und des präsynaptischen Proteins vGlut1. **A**) Dendrit eines Interneurons, bildliche Trennung der PSD-95+ Puncta in synaptische (PSD-95+/vGlut1+) und Einzel-PSD-95+ Puncta (PSD-95+/vGlut1-); **B-D**) Die Quantifizierung zeigte, dass sich synaptische PSD-95+ Puncta in Fläche und Intensität von PSD-95+/vGlut1- Einzel-Puncta in allen Genotypen unterscheiden. *Nrg3*^{-/-} Interneurone besaßen eine geringere Fläche der synaptischen und nicht synaptischen Puncta (C) sowie eine leicht reduzierte Intensität der PSD-95-Expression der nicht synaptischen PSD-95-Strukturen (D). (Einheit Intensität: Anteil vom Maximum=100%; SEM angegeben, n=5 Tiere pro Gruppe; N=282 Zellen; *=p<0,05; **=p<0,01); Maßstab: 10 μm

Ich prüfte in einem nächsten Experiment, ob der Effekt auf Synapsen in *Nrg3*-mutanten Kulturen durch Zugabe von konditioniertem Medium beeinflusst werden konnte. Zwei verschiedenen konditionierte Medien wurden eingesetzt, d.h. Überstände von *Nrg3*^{-/-} und *Nrg3*^{+/-} Kulturen hoher Zelldichte. Wie Abbildung 3.15A zeigt, war die Zahl der PSD-95+ Puncta in *Nrg3*^{-/-} mutanten Zellen signifikant erhöht, wenn sie in Medium von *Nrg3*^{+/-} Zellen wuchsen (Abb. 3.15A). Einen ähnlichen, allerdings nicht statistisch signifikanten Trend beobachtete ich in Kulturen von *Nrg3*^{+/-} Zellen. Die Größe der Puncta änderte sich aber nicht (Abb. 3.15.B). Konditioniertes Medium, das Nrg3 enthielt, erhöhte also die Zahl, aber nicht die Größe der PSD-95+ Puncta auf Interneuronen.

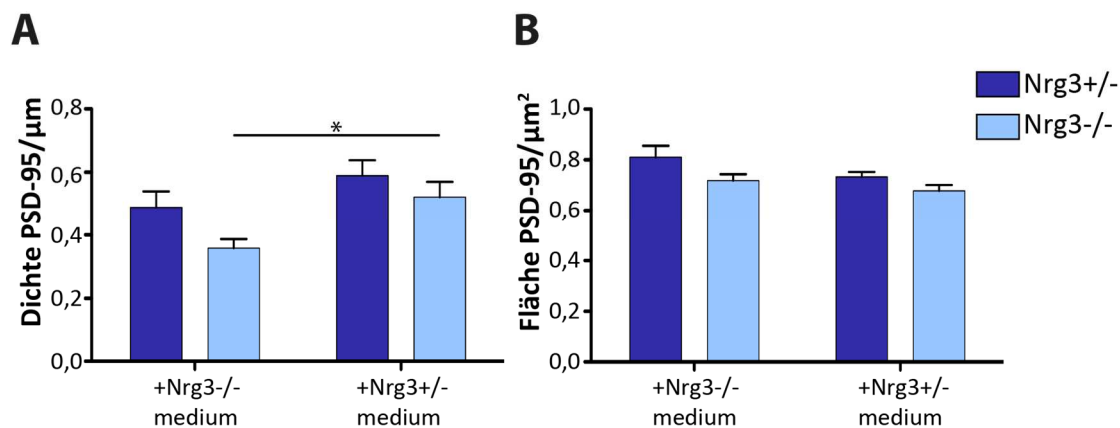


Abbildung 3.15 Nrg3-enthaltendes Medium fördert PSD-95-Puncta auf kortikalen ErbB4+ Interneuronen

Betrachtung glutamaterger Synapsen kortikaler Interneurone durch Analyse der PSD-95-Expression von *Nrg3*^{+/-} und *Nrg3*^{-/-} Interneuronen. Die Wirkung von konditioniertem Medium, das von dichten *Nrg3*^{+/-} und *Nrg3*^{-/-}-Kulturen stammte, auf die Anzahl und Größe PSD-95+ Puncta wurde analysiert. Die Anzahl der PSD-95+ Puncta von *Nrg3*-mutanten Interneuronen war nur in konditioniertem Medium von *Nrg3*^{+/-} Zellen signifikant erhöht. Die Kultivierung in konditioniertem Medium änderte nicht die Puncta-Fläche. (SEM angegeben; n=4; N=139 Zellen; *=p<0,05)

3.3 Untersuchung der ErbB3- und ErbB4-Funktion im Muskel

Nrg1 und *ErbB2* sind essentiell für die Muskelspindeldifferenzierung (Andrechek et al., 2002; Hippenmeyer et al., 2002). *Nrg1*, das von sensorischen Neuronen exprimiert wird, induziert die Bildung von Muskelspindeln aus Muskelfasern (Hippenmeyer et al., 2002). Muskelfasern exprimieren die Neuregulin-Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 (Meyer und Birchmeier, 1995; Zhu et al., 1995). Diese Rezeptoren wurden ebenfalls in intrafusalen Muskelfasern nachgewiesen (Andrechek et al., 2002; Hippenmeyer et al., 2002). Ich visualisierte Muskelspindeln von Mäusen im Embryonalstadium E18.5, indem ich die Expression von Myosin und *Egr3*, einem Zinkfinger Transkriptionsfaktor, analysierte; *Egr3* wird in intrafusalen Fasern der Spindeln, aber nicht in anderen Muskelfasern exprimiert (Hippenmeyer et al., 2002).

Um zu analysieren, welcher *Nrg1*-bindende Rezeptor zusammen mit ErbB2 im Muskel agiert, benutzte ich muskelspezifische Mutanten für *ErbB3* und *ErbB4*. Dazu wurden Mäuse, die ‚gefloxt‘ *ErbB3* und *ErbB4* Allele trugen, eingesetzt, und die muskelspezifische Mutation wurde mittels *Lbx1^{Cre}* induziert. *Lbx1^{Cre}* wird in allen migrierenden Muskelvorläuferzellen exprimiert (Vasyutina et al., 2007). Ich quantifizierte die Anzahl der Muskelspindeln des Muskels Tibialis anterior (TA-Muskel) des rechten Hinterbeins am Ende der Embryonalentwicklung (E18.5) und in adulten Tieren (P60). Dabei beobachtete ich, dass *Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}* Mäuse keine Muskelspindeln in den Extremitäten besaßen, die Anzahl der Spindeln in *Lbx1^{Cre};ErbB4^{ff}* Mäusen aber mit denen der Kontrollmäuse vergleichbar war (Abb. 3.16). Weiterhin konnte ich zeigen, dass die Muskelspindeln in *Lbx1^{Cre};ErbB4^{ff}* Mäusen keine Veränderung in Länge oder Anzahl der intrafusalen Fasern aufwiesen (Abb. 3.16). Trotz der Abwesenheit von Muskelspindeln konnte ich PV+ sensorische Nervenendigungen in den Skelettmuskeln beobachten (E18.5, Abb. 3.17).

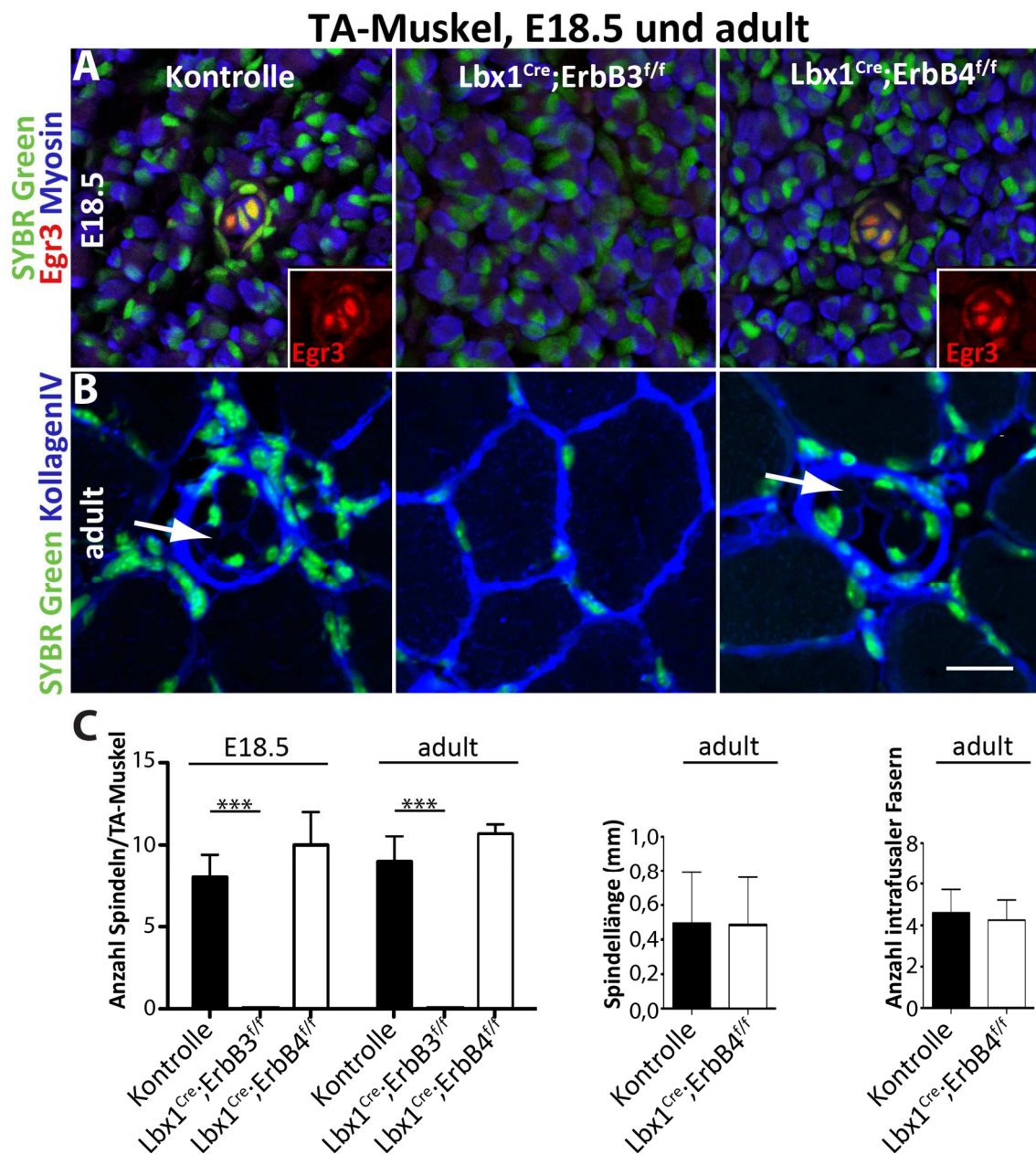


Abbildung 3.16 ErbB3, aber nicht ErbB4, ist essentiell für die Entwicklung von Muskelspindeln

Immunhistologische Analyse der Muskelspindeln des TA-Muskels von $Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}$ und $Lbx1^{Cre};ErbB4^{ff}$ Mäusen durch Betrachtung der Proteine Egr3 (E18.5,A) und KollagenIV (adult,B). **A**) Egr3 markiert Muskelspindeln und konnte in Extremitätenmuskeln von $Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}$ nicht beobachtet werden. **B**) Muskelspindeln in $ErbB4$ -mutantem Muskelgewebe waren unverändert. **C**) Die Quantifizierung bestätigte, dass in $ErbB3$ -Mutanten keine Muskelspindeln nachweisbar waren und die Anzahl, Länge und Anzahl der intrafusalen Fasern (Pfeil) der $ErbB4$ -mutanten Muskelspindeln unverändert waren. (SEM angegeben, $n > 3$ Tiere pro Gruppe; ***= $p < 0,001$; SYBR Green: Kernfarbstoff) Maßstab: 20 μ m

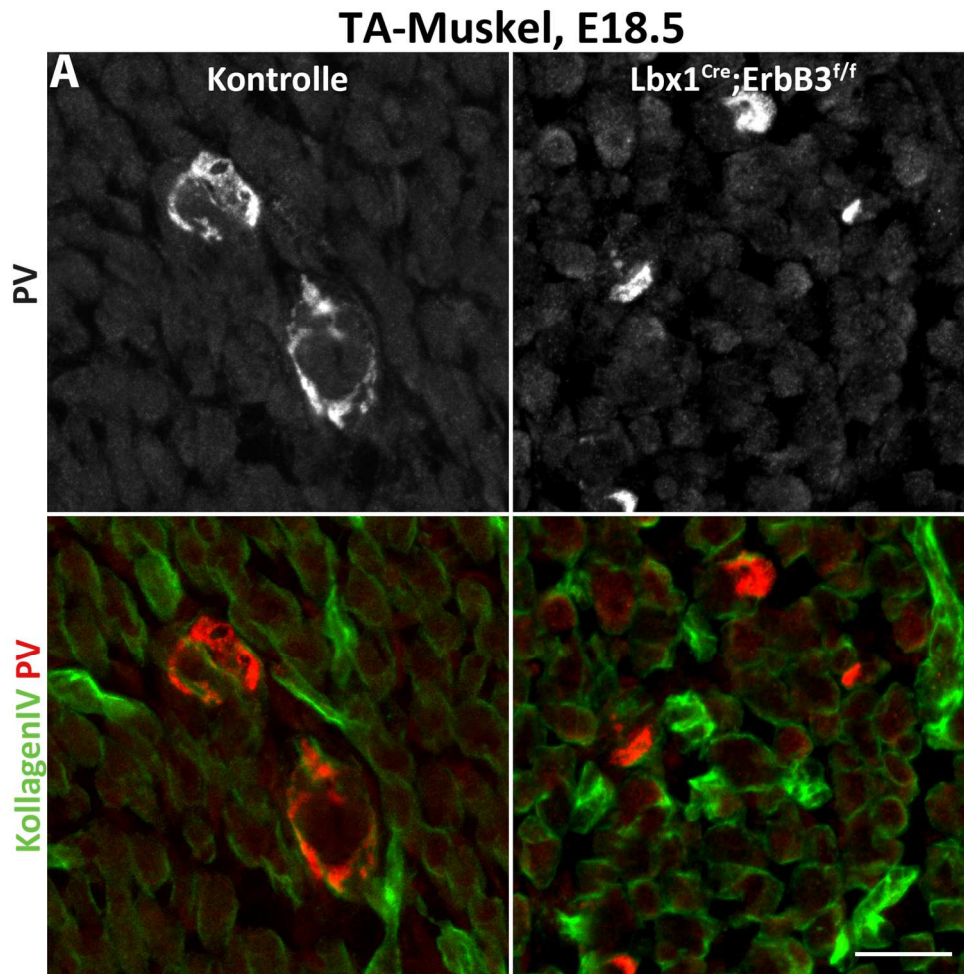


Abbildung 3.17 Die sensorische Muskelinnervierung von *Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}* Mäusen im Muskel

Analyse der sensorischen Nerven im Embryonalstadium E18.5 durch Betrachtung der Parvalbumin-Expression von *Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}* Mäusen. KollagenIV umschließt einzelne Muskelfasern. Die Analyse des TA-Muskels von *Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}* Mäusen zeigte, dass der Verlust von ErbB3 im Muskel keinen Einfluss auf das Vorhandensein sensorischer Nerven hatte. (PV: Parvalbumin, TA: Tibialis Anterior)

Maßstab: 20µm

4 Diskussion

4.1 Die Funktion von Nrg3 in Migration und Differenzierung kortikaler

Interneurone in vivo

Die Inhibition kortikaler Pyramidenzellen durch Interneurone ist essentiell für das korrekte elektrophysiologische Gleichgewicht im Gehirn und ihre Reduktion führt zu neurologischen Störungen (Le Magueresse und Monyer, 2013). Der ErbB4-Rezeptor wird ausschließlich von GABAergen Interneuronen des Kortex exprimiert, die vorwiegend in der medialen und kaudalen ganglionischen Eminenz sowie der „preoptic area“ entstehen. Ein Großteil dieser ErbB4+ Interneurone ko-exprimiert Parvalbumin (PV; Fazzari et al., 2010; Vullhorst et al., 2009; Yau et al., 2003). Ich konnte zeigen, dass ErbB4+ Interneurone im präfrontalen Kortex sowohl PV als auch Calbindin ko-exprimieren, wobei im primären somatosensorischen Kortex nur wenige Calbindin+/ErbB4+ Interneurone vorhanden sind. Bisher wurde nur die ErbB4-Population des Hippocampus, aber nicht des Kortex, ausführlich charakterisiert (Neddens und Buonanno, 2010).

In dieser Arbeit verwendete ich ausschließlich „heart-rescued“ *ErbB4*-mutante Mäuse (Tidcombe et al., 2003). In Studien des postnatalen Gehirns dieser *ErbB4*-Mutanten war die Anzahl von GABAergen Interneuronen reduziert, die PV+ Population war besonders stark beeinträchtigt (Buonanno und Fischbach, 2001; Fisahn et al., 2009, Flames et al., 2004). Auch in unserem Labor wurde dies bestätigt (Thomas Müller und Johannes Vogt). Im Hippocampus der *ErbB4*-Mutanten sind spezifisch nNos+ und PV+ Interneurone reduziert (Neddens und Buonanno, 2010). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde auf eine Funktion von ErbB4 für die Migration kortikaler Interneurone geschlossen (Flames et al., 2004). ErbB4 ist der einzige Nrg3 bindende Rezeptor und wird beginnend mit der Migrationsphase der Interneurone bis zum Erwachsenenstadium stark im Kortex exprimiert (Zhang et al., 1997). Deshalb untersuchte ich in dieser Arbeit die Anzahl und Identität der ErbB4+ Interneurone im Kortex von Wildtyp und *Nrg3*-mutanten Mäusen.

Thomas Müller stellte einen *Nrg3*-mutanten Mausstamm her. Die Mäuse waren hyperaktiv im „Open Field Test“ und wiesen eine erhöhte Impulsivitäts-Kontrolle auf (nicht publizierte Daten aus dem Labor von August Smit, Amsterdam). Aufgrund dieser Befunde war eine ausführliche Analyse des präfrontalen Kortex der *Nrg3*-Mutanten erforderlich. Ich konnte in

Nrg3-mutanten Mäusen keine Veränderungen in der Anzahl oder Identität der ErbB4+ Interneurone im primären somatosensorischen und präfrontalen Kortex feststellen. Auch die Anzahl der Interneurone im Hippocampus änderte sich im Großteil der Regionen nicht.

4.1.1 Die Charakterisierung ErbB4-exprimierender Interneurone im Kortex

Ich bestimmte die absolute Dichte der ErbB4+ Interneurone und die relativen Anteile von ErbB4+ Interneuronenpopulationen, die durch die Expression von PV, Calretinin, Somatostatin, Calbindin und Pro-CCK (Cholecystokinin) definiert wurden, im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex adulter Mäuse. Im Hippocampus betrachtete ich die Interneuronenmarker PV und nNos, da nur für diese Interneuronentypen eine Reduktion in *ErbB4*^{-/-} Mäusen festgestellt wurde (Neddens und Buonanno, 2010).

Die höchste Dichte von etwa 11.500 ErbB4-positiven Interneuronen pro mm³ ermittelte ich im medialen präfrontalen Kortex. Im primären somatosensorischen Kortex exprimierten 9.000 Interneurone pro mm³ ErbB4. Für den Hippocampus bestimmte ich eine durchschnittliche Dichte von 5.000 ErbB4+ Interneuronen pro mm³. Diese Zahl liegt in der gleichen Größenordnung wie die stereologisch bestimmte Dichte GABAerger Interneurone im Hippocampus (Jinno et al., 1998; Jinno et al., 2006). Ich schlussfolgerte daraus auf die Richtigkeit des von mir verwandten Zählverfahrens. Fisahn und Kollegen, Neddens und Buonanno identifizierten hingegen nur 1.200 bzw. 1.600 ErbB4+ Interneurone pro mm³ (Fisahn et al., 2009; Neddens und Buonanno, 2010). Diese Differenz erklärt sich unter anderem aus einer höheren Nachweisempfindlichkeit des anti-ErbB4 Antikörpers, der in unserem Labor hergestellt worden war. Ich verifizierte seine Spezifität an Schnitten von *ErbB4*-mutantem Gewebe. Dennoch zeichneten sich ähnliche Tendenzen der Interneuronenidentität im Hippocampus ab. In meinen Untersuchungen ko-exprimierte ein Großteil der ErbB4+ Interneurone PV, d.h. 24% im Stratum oriens des CA3 und höchstens 51% im CA1 Stratum pyramidale. nNos+ Interneurone bildeten ebenfalls einen großen Anteil, d.h. 30-50%, der ErbB4-Population des Hippocampus.

Im präfrontalen Kortex zeigte ich, dass 50%, 27%, 15% und 9% der ErbB4+ Interneurone die Marker PV, Calbindin, Calretinin bzw. Somatostatin ko-exprimierten. Im Gegensatz dazu war im primären somatosensorischen Kortex nur ein sehr geringer Anteil der ErbB4-Population Calbindin-positiv. Ich stellte außerdem fest, dass die Verteilung der Marker PV, Calretinin

und Somatostatin in der ErbB4-Population in beiden Regionen vergleichbar war. In beiden Regionen waren über 95% der PV+ Interneurone ErbB4-positiv. Dagegen ko-exprimierten geringere Anteile der Calretinin+ (40%) und Sst+ (<20%) Populationen ErbB4. Gegenüber den Ergebnissen von Fazzari und Kollegen waren die von mir bestimmten Anteile der ErbB4-ko-exprimierenden PV+ und Cr+ Interneurone deutlich größer (Fazzari et al., 2010). Das erklärt sich ebenfalls aus der erhöhten Sensitivität des verwendeten ErbB4-Antikörpers. Den Anteil der ErbB4+ Zellen an der Population der Calbindin Interneurone konnte ich nicht bestimmen, da eine Subpopulation der Pyramidenzellen ebenfalls Calbindin exprimiert (DeFelipe, 1997). Zusammen mit der relativ großen Zahl der Calbindin+/ErbB4+ Interneurone im präfrontalen Kortex zeigen meine Daten eine größere Vielfalt der ErbB4-exprimierenden Interneurone, als bisher angenommen wurde. Das bedeutet, dass bei der Aufklärung der pathophysiologischen Funktionen von Neuregulin und ErbB4-Signalen auch diese Interneuronentypen betrachtet werden sollten.

PV+ Interneurone entstehen in der medialen ganglionischen Eminenz und gehören zu den Chandelier und Basket-Zellen, sie sind meist schnell feuernd und beeinflussen Gamma-Oszillationen, die der Signalleitung im kortikalen Netzwerk dienen, wie durch die Anwendung der Optogenetik gezeigt wurde (Sohal et al., 2009). Ihre Reduktion resultiert in fehlender Inhibition im Kortex, die zur Erhöhung von Gamma-Oszillationen führen kann (Yizhar et al., 2011). Für ErbB4/Nrg1-Signale wurde ebenfalls gezeigt, die Gamma-Oszillationen des Hippocampus zu beeinflussen (Del Pino et al., 2013; Fisahn et al., 2009). Die Fehlfunktion der Population der PV+ Interneurone wird stark in der Entstehung von neurologischen Erkrankungen wie Epilepsie und Autismus diskutiert (Lewis et al., 2005; Marin, 2012).

Die Population der Calbindin+ Interneurone hat ihren Ursprung in der medialen ganglionischen Eminenz und umfasst ebenfalls Chandelier- und „Basket“-Zellen, sie bildet außerdem einen Anteil der Martinotti- und „Double Bouquet“-Zellen (Ghanem et al., 2007; Markram et al., 2004). Die langen Fortsätze der „Double Bouquet“-Zellen erstrecken sich vertikal über mehrere Schichten des Kortex und erreichen somit eine große Zahl von Pyramidenzellen (DeFelipe, 1997; Kawaguchi und Kubota, 1993; Toledo-Rodriguez et al., 2004). Ihre Reduktion wurde sowohl in der migrierenden Interneuronenpopulation der *ErbB4*-Mutante als auch in Schizophreniepatienten festgestellt, aber ihre Ko-Expression mit

ErbB4 wurde bisher nicht betrachtet (Beasley et al., 2002; Chance et al., 2005; Flames et al., 2004).

nNos Typ1-exprimierende („neuronal nitric oxide synthase“) Interneurone entstehen in der medialen als auch kaudalen Eminenz (Magno et al., 2012). Sie ko-exprimieren überwiegend Somatostatin und bilden einen Teil der „Bitufted“ Zellen, die ebenfalls axodendritisch und vertikal inhibieren, aber hauptsächlich nahe gelegene Pyramidenzellen erreichen (Magno et al., 2012; Markram et al., 2004). Es wurden verschiedene Polymorphismen, die zur Überexpression des Enzyms führen, in Schizophreniepatienten festgestellt (Silberberg et al., 2010). Die Menge an Somatostatin mRNA im präfrontalen Kortex von Schizophreniepatienten war dagegen reduziert (Fung et al., 2010).

Calretinin-exprimierende Interneurone entstehen in der kaudalen ganglionischen Eminenz und gehören wie Calbindin+ Interneurone unter anderen den „Double Bouquet“-Zellen an (De Marco Garcia et al., 2011; Markram et al., 2004). Bisher konnte keine Änderung der von Calretinin mRNA in Schizophreniepatienten beobachtet werden (Fung et al., 2010; Lewis et al., 2005).

Die von mir gezeigte Vielfalt der ErbB4-Population geht mit bisherigen Beobachtungen, die eine Funktion des Rezeptors zu Beginn der Migration annehmen, konform. Die postmitotische Expression des ErbB4-Rezeptors in kortikal migrierenden Zellen und die Reduktion der tangentialen Migration in *ErbB4*-mutanten Mäusen stützen ebenfalls die Vermutung, dass ErbB4 ein für die tangential Migration verantwortlicher Rezeptor ist, der auf Signale des komplementär exprimierten Ig-Nrg1 im Kortex und CRD-Nrg1 im Striatum reagiert (Flames et al., 2004). Die Interneuronen-Populationen entstehen vorwiegend in der medialen ganglionischen Eminenz, der kaudalen Eminenz und der „preoptic area“ (Marin und Rubenstein, 2003). Die breite Expression von ErbB4 in allen Regionen während der Kortikogenese und die vergleichsweise geringe Reduktion der Interneurone in der *ErbB4*-Mutante lassen dagegen auf eine modulatorische Funktion von ErbB4 für die Migration schließen (Flames et al., 2004; Yau et al., 2003).

Obwohl viele Autoren eine Reduktion von kortikalen Interneuronen in *ErbB4*-Mutanten ermittelt haben, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, wenn *ErbB4* konditionell mit Hilfe des *Dlx5/6^{Cre}* oder *Lhx6^{Cre}* Allels mutiert wurde (Del Pino et al., 2013; Fazzari et al., 2010). Diese Diskrepanz wurde von den Autoren damit erklärt, dass *ErbB4* in diesen

Mutanten zu spät während der Entwicklung rekombiniert wurde (Del Pino et al., 2013; Fazzari et al., 2010). Die Analyse von Flames und Kollegen zeigen eine erhebliche Ko-Lokalisation von Lhx6 und ErbB4-exprimierenden Zellen während der Embryogenese und meine Daten weisen ebenfalls auf eine vorwiegend postmitotische Expression von ErbB4 in der medialen ganglionischen Eminenz hin (Flames et al., 2004). Das würde bedeuten, dass die Rekombination von *ErbB4* durch das *Lhx6^{Cre}* Allel ebenfalls zu spät stattfindet oder ErbB4 keine essentielle Funktion für die Migration hat.

4.1.2 *Nrg3* hat keinen Einfluss auf Anzahl und Differenzierung von ErbB4+ Interneuronen im Kortex und Hippocampus

In meiner Arbeit analysierte ich die Gesamtzahl der ErbB4+ Interneurone und die Anteile verschiedener Subpopulationen im präfrontalen und primären somatosensorischen Kortex und im Hippocampus adulter Kontroll und *Nrg3*-mutanter Mäuse.

Ich konnte lediglich im CA1 Stratum oriens eine signifikante Reduktion der ErbB4+/PV+ Interneurone feststellen. Im CA1 Stratum lacunosum moleculare beobachtete ich ebenfalls eine Reduktion der ErbB4+/nNos+ Interneurone, diese wies allerdings einen höheren Fehler (5%) auf. Die geringe Neuronendichte des Stratum oriens der CA1-Region und die hohe Dichte von ErbB4+ Interneuronen im Stratum lacunosum moleculare konnten hingegen zu Fehlern bei der Quantifizierung führen, deshalb müssen diese Ergebnisse weiter überprüft werden. In der *ErbB4*-Mutante waren die PV+ Interneurone des CA1 Stratum oriens ebenfalls reduziert (Neddens und Buonanno, 2010).

Li und Kollegen beobachteten im Kortex von Mausembryonen durch ektopische Expression, dass exogenes *Nrg1* und *Nrg3* die Migration kortikaler Interneurone beeinflussen kann und dass sie dabei als Repellent für ErbB4+ Interneurone wirken können (H. Li et al., 2012). Da während der späten Embryogenese *Nrg3* sehr stark in der kortikalen Platte exprimiert wird, durch die ErbB4+ Interneurone in den Kortex einwandern, und wir keine veränderte Anzahl von ErbB4+ Interneuronen im adulten Gehirn von *Nrg3*-Mutanten festgestellt haben, erscheint es unwahrscheinlich, dass endogenes *Nrg3* diese Funktion ausübt.

In meiner Arbeit habe ich die ErbB4-Population im präfrontalen, somatosensorischen Kortex und im Hippocampus ausführlich charakterisiert und konnte keine Veränderungen der

ErbB4 Interneuronenpopulationen im Kortex und nur geringfügige im Hippocampus von *Nrg3*-mutanten Mäuse feststellen. Daraus schließe ich, dass *Nrg3* weder die Migration noch die Differenzierung der ErbB4+ Interneurone beeinflusst.

4.2 Die Funktion von *Nrg1*, *Nrg3* und ErbB4 in der Bildung glutamaterger Synapsen auf inhibitorischen Neuronen in vitro

Nrg1, *Nrg3* und ErbB4 sind Risikogene für Schizophrenie (Benzel et al., 2007; Bertram et al., 2007; P. L. Chen et al., 2009; Hashimoto et al., 2004; Stefansson et al., 2003; Stefansson et al., 2002). Mithilfe neurophysiologischer Untersuchungen und Experimenten an Zellkulturen wurde gezeigt, dass *Nrg1*/ErbB4-Signale die Innervation im Kortex beeinflussen (Buonanno und Fischbach, 2001; Y. J. Chen et al., 2010; Fazzari et al., 2010; Ting et al., 2011). Außerdem wurde bei der Analyse kortikaler Interneurone der *ErbB4*^{-/-} Mauslinie in vivo eine Reduktion von presynaptischen glutamatergen (vGlut1+) Puncta auf Dendriten kortikaler Interneuronen festgestellt (Del Pino et al., 2013; Fazzari et al., 2010). In vitro Beobachtungen von Ting und Kollegen bestätigten diesen Befund durch die Wirkung von exogenem *Nrg1* in kortikalen Zellkulturen (Ting et al., 2011). Der Zusatz von *Nrg1* erhöhte die Zahl postsynaptischer PSD-95+ Puncta in vitro und die Inhibition von endogenem Neuregulin durch Zusatz der löslichen Domäne des ErbB4-Rezeptors reduzierte die Zahl der PSD-95-Puncta in Interneuronen (Ting et al., 2011). Allerdings wurden diese Ergebnisse nur in Kulturen mit geringer Dichte und nur bis zum Tag 15 beobachtet, *Nrg1* hatte keine signifikante Wirkung auf ältere und dichtere Neuronenkulturen (Ting et al., 2011).

Ich analysierte die Verteilung des ErbB4-Rezeptors auf der dendritischen Membran sowie seine Ko-Lokalisation mit *Nrg3* und prä- und postsynaptischen Proteinen. Ich untersuchte den Effekt von *Nrg1* und *Nrg3* auf die Synaptogenese in Kontroll- und *ErbB4*-mutanten Interneuronen und zeigte, dass in *ErbB4*-mutanten Interneuronen die Anzahl der PSD-95-Puncta reduziert ist und nicht durch die Zugabe von exogenem *Nrg1* erhöht werden kann. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass *Nrg3* ebenfalls die Synaptogenese in Interneuronen fördert.

4.2.1 Die subzelluläre Lokalisation von Nrg3 und ErbB4

Elektronenmikroskopisch wurde ErbB4 in der Dendritenplasmamembran von Interneuronen innerhalb und außerhalb postsynaptischer Strukturen glutamaterger Synapsen beobachtet (Fazzari et al., 2010; Vullhorst et al., 2009). Meine Analyse bestätigte, dass ErbB4 in der Plasmamembran der Somata und Dendriten von GABAergen Interneuronen lokalisiert ist, aber nicht in deren Axonen. Ich konnte außerdem beobachten, dass der Rezeptor ungleichmäßig in der Zellmembran verteilt ist und in punktförmigen Strukturen akkumuliert. PSD-95 markiert Cluster postsynaptischer Proteine, die als „postsynaptic densities“ (PSDs) bezeichnet werden. Der Kontakt mit glutamatergen Axonendigungen führt zur Bildung von Synapsen, die immunchemisch durch die Ko-Lokalisation postsynaptischer (PSD-95) und präsynaptischer Strukturen (Synapsin, vGlut1) nachgewiesen werden können (Okabe et al., 2001). Meine Analysen ergaben, dass vGlut1+/PSD-95+ Synapsen eine erhöhte Menge an PSD-95 im Vergleich zu Puncta, die keine Synapsen mit vGlut1+ Axonen bildeten, enthielten. Eine Funktion von ErbB4 in glutamatergen Synapsen und seine Ko-Lokalisation mit PSD-95 und Synapsin wurde 2000 von Huang und Kollegen biochemisch gezeigt (Y. Z. Huang et al., 2000). Ma und Kollegen bestätigten diese Beobachtungen ebenfalls biochemisch und ergänzten, dass sich ErbB4 durch Nrg1-Signale auf der Zellmembran bewegt (L. Ma et al., 2003). Ich charakterisierte in über 1000 Interneuronen die Ko-Lokalisation von ErbB4 und PSD-95. Die Intensität des ErbB4-Signals in PSD-95+ Puncta war deutlich erhöht im Vergleich zum mittleren Signal über den gesamten Dendriten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass ErbB4 wie PSD-95 in Synapsen akkumuliert und den Lipid-Raft-Proteinen angehört (L. Ma et al., 2003).

Nrg3 wird während der Embryogenese im Zentralnervensystem gebildet und wird scheinbar von allen Neuronen exprimiert (Cahoy et al., 2008; Zhang et al., 1997; nicht publizierte *in situ*-Hybridisierung-Daten von Thomas Müller). Der benutzte anti-Nrg3-Antikörper ist der einzige Antikörper, der Nrg3 immunhistochemisch erkennt und ist gegen die EGF-Domäne von Nrg3 gerichtet. An Hirnschnitten detektiert der Antikörper spezifisch Nrg3 im Neuropil und an der somatischen und dendritischen Oberfläche von ErbB4+ Interneuronen (Beobachtung von Thomas Müller). Das Signal auf der Zelloberfläche ist abhängig von ErbB4, was auf eine Bindung von Nrg3 an ErbB4 auf der Oberfläche von Interneuronen hinweist. Intrazelluläres Nrg3 und damit die Nrg3-produzierenden Zellen sind auf Hirnschnitten nicht erkennbar.

Die Verteilung des Proteins in Neuronenkulturen wurde bisher nicht analysiert. Ich konnte eine punktförmige Lokalisation von Nrg3 auf ErbB4+ Interneuronen beobachten. Nrg3 lokalisierte vorwiegend mit ErbB4-dichten Strukturen. Interessanterweise war diese Kolo-kalisation auf *GAD67^{GFP}*-markierten Wildtyp Interneuronen, die auf einem Rasen von *Nrg3*-mutanten Zellen kultiviert wurden, nicht zu beobachten (Beobachtung von Thomas Müller). Daraus schlussfolgerten wir, dass das oberflächliche Nrg3 auf ErbB4+ Interneuronen parakrinen Ursprungs ist. In Wildtyp Kulturen stellte ich fest, dass etwa 40% der glutamatergen Puncta sowohl ErbB4+ als auch Nrg3+ waren. Die hohe Ko-Lokalisation von Nrg3, ErbB4 und vGlut1 ließ auf eine Funktion von Nrg3/ErbB4-Signalen in der glutamatergen Innervation von Interneuronen schließen, die ich in kortikalen *Nrg3^{-/-}* Kulturen analysierte.

4.2.2 Nrg1 und Nrg3 fördern die glutamaterge Synaptogenese auf Interneuronen

Es wurde beschrieben, dass die Aktivierung von ErbB4 durch exogenes Nrg1 die Bildung und/oder Lokalisierung prä- und postsynaptischer Proteine erhöht (Fazzari et al., 2010; Ting et al., 2011). Zunächst prüfte ich die in vivo festgestellte Beobachtung, dass die glutamaterge Innervation von GABAergen Interneuronen in *ErbB4^{-/-}* Mäusen reduziert ist (Fazzari et al., 2010). Da synaptische Proteine in vivo schwierig zu quantifizieren sind, kultivierte ich Zellen von neugeborenen Mäusen und analysierte die Expression von PSD-95 in Interneuronen. Um die Variabilität verschiedener Zellkulturen zu minimieren, untersuchte ich eine Kultur die ein Gemisch von *ErbB4^{+/-};GAD67^{GFP}* und *ErbB4^{-/-};GAD67^{GFP}* Zellen enthielt. Ich beobachtete, dass Interneurone, die kein ErbB4 exprimierten, deutlich weniger PSD-95+ Puncta aufwiesen als *ErbB4*-heterozygote Interneurone und konnte so die in vivo gemachten Beobachtungen bestätigen. Der Zusatz von exogenem Nrg1 erhöhte die Anzahl der PSD-95+ Puncta und der PSD-95+/vGlut1+ Synapsen selektiv auf *ErbB4^{+/-}* Interneuronen. ErbB4 in Interneuronen war somit essentiell für die Wirkung von Nrg1. Die Wirkung von Nrg1 war nur in Kulturen geringerer Zelldichte beobachtet worden (Ting et al., 2011). Ich konnte aber die Reduktion der PSD-95+ Puncta auf ErbB4+ Interneuronen auch in Kulturen mit höherer Dichte beobachten. Da für *ErbB4*-Mutanten sowie für konditionelle *ErbB4^{fl/fl};Lhx6^{Cre}* Mäuse in vivo ebenfalls eine Reduktion glutamaterger Puncta auf

Interneuronen gezeigt wurde, scheint diese Reduktion nicht abhängig von der Neuronendichte zu sein.

Die Ko-Lokalisation von ErbB4 und Nrg3 mit Markern glutamaterger Synapsen führte mich zu der Frage, ob Nrg3 ebenfalls die Bildung von PSD-95 beeinflusste. Bei der Analyse von *Nrg3*^{-/-} Kulturen konnte ich eine Reduktion der Anzahl und Größe der PSD-95+ Puncta beobachten. Wurden die Neurone in höherer Dichte kultiviert, war die Reduktion der PSD-95+ Puncta in *Nrg3*^{-/-} Kulturen allerdings gering. Ting und Kollegen beobachteten ebenfalls, dass die Wirkung von Nrg1 auf Wildtyp Neurone abhängig von deren Dichte in Kultur war (Ting et al., 2011). Die Reduktion der Anzahl der PSD-95-Puncta konnte in *Nrg3*^{-/-} Kulturen durch Zugabe von konditioniertem Medium von dicht kultivierten Kontrollzellen, aber nicht von *Nrg3*^{-/-} mutanten Zellkulturen, ausgeglichen werden. Bisher war kein rekombinantes Nrg3 verfügbar. Daher konnte ich nicht prüfen, ob Nrg3 direkt die Bildung glutamaterger Synapsen in ErbB4+ Interneuronen fördert, oder ob das konditionierte Medium einen anderen Wirkstoff enthält, der Nrg3-abhängig in Neuronenkultur produziert wurde. Die starke Wirkung von Nrg3-enthaltendem Medium auf die Anzahl der PSD-95-Puncta sowie ihre Reduktion in *Nrg3*^{-/-} Interneuronen legen aber eine Funktion von Nrg3 in der Bildung von PSD-95+ „postsynaptic densities“ nahe.

4.2.2.1 Mögliche Funktionen von Nrg3, zukünftige Fragestellungen

Die Bindungsaffinität (Kd) von Nrg3 für ErbB2/ErbB4 Heterodimere liegt in der Größenordnung von 100nM und ist damit etwa 100 bis 1000mal höher als die von Nrg1 (Jones et al., 1999). Beobachtungen von Dr. Thomas Müller zeigen, dass das Nrg3 Protein in hohen Mengen im Gehirngewebe vorkommt und eine Konzentration von 100nM erreicht. Diese Konzentration wäre demnach ausreichend, um einen signifikanten Anteil von ErbB4 zu binden. Ich konnte den starken Oberflächen-Besatz von Nrg3 an ErbB4+ Interneuronen zeigen. Diese Nrg3-Puncta ko-lokalisierten mit dem ErbB4-Rezeptor, der ebenfalls in Puncta lokalisiert ist, und für den eine Funktion in der glutamatergen Innervation in verschiedenen Studien beschrieben wurde (Fazzari et al., 2010; Krivosheya et al., 2008; B. Li et al., 2007; Ting et al., 2011). Meine Analyse von kortikalen Zellkulturen zeigte die Reduktion von PSD-95-Puncta in *Nrg3*^{-/-} mutanten Kulturen. Es liegt somit nahe, dass Nrg3 eine Funktion an glutamatergen Synapsen auf ErbB4+ Interneuronen hat.

Nrg3^{-/-} Mutanten sind hyperaktiv im „Open Field Test“ und weisen eine erhöhte Impulsivitäts-Kontrolle auf (nicht publizierte Daten aus dem Labor von August Smit, Amsterdam). Dieser Phänotyp entspricht den Verhaltensdefiziten der *ErbB4*^{-/-} und konditionellen *ErbB4*-Mutanten, die ebenfalls eine erhöhte Aktivität im „Open Field Test“ und eine Reduktion glutamaterger Puncta auf Interneuronen aufwiesen (Y. J. Chen et al., 2010; Del Pino et al., 2013; Golub et al., 2004; Krivosheya et al., 2008; Wen et al., 2010). Die vergleichbaren Defizite der *Nrg3*^{-/-} und *ErbB4*^{-/-} Mäuse sowohl in der glutamatergen Reizleitung als auch in Verhalten lassen auf eine Funktion von *Nrg3* durch *ErbB4* in der glutamatergen Innervation von Interneuronen schließen.

4.3 Die Funktion von ErbB3 und ErbB4 im Muskel

Muskelspindeln entstehen mit dem Kontakt sensorischer Nervenendigungen an Muskelfasern, die die intrafusalen Fasern der Spindel bilden (Maier, 1997; Walro und Kucera, 1999). Das Ig-Nrg1-Signal afferenter Nerven ist für die Bildung und Erhaltung von Muskelspindeln essentiell (Cheret et al., 2013; Hippenmeyer et al., 2002). Der ErbB2-Rezeptor kann durch das *Nrg1*-Signal aktiviert werden und wird, wie ErbB3 und ErbB4, von intrafusalen Fasern der Spindel exprimiert (Andrechek et al., 2002; Hippenmeyer et al., 2002; Leu et al., 2003). Die Expression von ErbB2 im Muskel ist essentiell für die Differenzierung von Muskelspindeln (Andrechek et al., 2002; Leu et al., 2003). Es wurde bisher kein Ligand für ErbB2 identifiziert, deshalb war unklar, welcher ErbB2 Ko-Rezeptor *Nrg1* in der Muskelspindel bindet. Durch muskelspezifische Mutation von ErbB3 und ErbB4 in *Lbx1*^{Cre};*ErbB3*^{ff} und *Lbx1*^{Cre};*ErbB4*^{ff}-Mäusen konnte ich zeigen, dass ErbB3, nicht ErbB4, essentiell für die Differenzierung von Muskelspindeln und somit ErbB3 der *Nrg1*-bindende Rezeptor in intrafusalen Muskelfasern ist. Da die Rezeptoren ErbB2-4 in intrafusalen Fasern erscheinen, bleibt offen, ob ErbB2/ErbB4 Heterodimere oder ErbB4 Homodimere eine andere Funktion in der Muskelspindel erfüllen. Ich konnte feststellen, dass die muskelspezifische Mutation von ErbB4 weder die Länge noch die Anzahl intrafusaler Fasern im Muskel beeinflusst, also kompensiert das ErbB2/ErbB3-Dimer für den Verlust des ErbB4-Rezeptors oder ErbB4 erfüllt eine andere oder keine Funktion im Muskel.

Ich stellte fest, dass afferente Nerven in Muskelfasern von *ErbB3*-Mutanten vorhanden waren. Sowohl die nervenspezifische Mutation von *Nrg1* als auch die muskelspezifische

Elimination von *ErbB2* verursachen gestörte Verzweigungen der sensorischen Nervenenden im Muskel (Hippenmeyer et al., 2002; Leu et al., 2003).

Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}-Mäuse zeigen Verhaltensauffälligkeiten im „Grip-Test“: *Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}*-Mäuse konnten sich deutlich schlechter am Gitter festhalten als Kontrolltiere (Beobachtung von Cyril Cheret; Test: Coughenour et al., 1977). Dieses Verhalten weist auf fehlende Propriozeption im Muskel hin. Zusätzlich war die Koordination der Extremitäten von *Lbx1^{Cre};ErbB3^{ff}*-Mäusen beeinträchtigt und resultierte in einem verändertem Gang (Beobachtung von Dr. Cyril Cheret; Test: Beare et al., 2009). Diese Phänotypen wurden auch in vergleichbarer Ausprägung bei nervenspezifischen *Ig-Nrg1*-Mutanten, die eine reduzierte Anzahl an Muskelspindeln aufweisen, beobachtet und charakterisieren also die Auswirkung der reduzierten Propriozeption im Muskel (Cheret et al., 2013).

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung Deutsch

Die Neureguline *Nrg1-4* gehören zu einer Familie von Wachstumsfaktoren die eine EGF Domäne besitzen (EGF: epidermal growth factor). Die Aktivierung von ErbB-Rezeptoren durch Neureguline regelt u.a. die Migration und Proliferation von Zellen in der Entwicklung. Der *Nrg1/ErbB4*-Signalweg hat eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung von exzitatorischen Signalen im Gehirn. Fehlt der Rezeptor ErbB4 in GABAergen Interneuronen, so ist ihre Migration während der Embryonalentwicklung gestört und ihre Anzahl in adulten Mäusen reduziert. Ich konnte zeigen, dass die Population der ErbB4+ Interneurone im präfrontalen Kortex sowohl Parvalbumin, als auch Calbindin-Neurone enthält. Weiterhin konnte ich beobachten, dass exogenes *Nrg1* die Anzahl exzitatorischer Synapsen auf kortikalen Interneuronen erhöht und dieser Effekt durch die *Nrg1/ErbB4*-Signalkaskade vermittelt wird. Die Unterbrechung des *Nrg3/ErbB4*-Signalwegs resultiert ebenfalls in einer Reduktion glutamaterger Synapsen auf ErbB4-positiven Interneuronen. Das *Nrg3*-Signal hat jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl oder Identität kortikaler Interneurone im präfrontalen oder somatosensorischen Kortex. Im Hippocampus von *Nrg3*-Mutanten war die Zahl an Interneuronen weitgehend unverändert, nur im CA1 Stratum oriens war die Population der Parvalbumin und ErbB4-exprimierenden Interneurone reduziert.

Frühere Arbeiten zeigen, dass sowohl *Nrg1* als auch ErbB2 für die Induktion von Muskelspindeln essentiell sind. Um festzustellen, welcher Rezeptor *Nrg1* in Muskelspindeln bindet, ErbB3 oder ErbB4, analysierte ich Mäuse, in denen jeweils die Gene der ErbB3-oder ErbB4-Rezeptoren konditionell in Skelettmuskeln ausgeschaltet wurden. Muskelspindeln fehlten nur in den Muskeln, in denen *ErbB3* mutiert wurde. Im Tibialis anterior (TA) Muskel der Mäuse, in dem das *ErbB4* Gen mutiert wurde, befand sich eine ähnliche Anzahl von Muskelspindeln wie in den Kontrollen. Ich konnte so feststellen, dass ErbB3 der essentielle *Nrg1* Rezeptor in den Entwicklung von Muskelspindeln ist.

5.2 Summary

Neuregulins are members of the EGF-family of growth factors (EGF, epidermal growth factor). Their binding and activation of ErbB receptors regulate migration and proliferation of cells during development. Nrg1/ErbB4 signals were shown to influence excitatory signals in the cortex, and in particular mutation of *ErbB4* disturbs migration of interneurons, resulting in their reduced numbers in the adult cortex. I could verify that addition of exogenous Nrg1 increases the number of excitatory synapses. Additionally I could verify that this effect is mediated through ErbB4. Interestingly, ablation of Nrg3 signals results also in loss of excitatory synapses. Mutation of Nrg3 does however not affect the number, distribution or the identity of ErbB4+ interneurons.

Nrg1 and ErbB2 are known to be essential for differentiation of muscle spindles. To elucidate, which receptor is binding Nrg1 in muscle spindles, I analyzed muscle specific mutants of *ErbB3* and *ErbB4*. Mice lacking a functional ErbB3 receptor in muscles did not develop muscle spindles, whereas muscle spindles of correct morphology were present in normal numbers in ErbB4 mutant mice. This demonstrates that the ErbB3 receptor, together with ErbB2, transduces Nrg1 signals during muscle spindle development.

Literatur

Alimandi, M., Romano, A., Curia, M.C., Muraro, R., Fedi, P., Aaronson, S.A., Di Fiore, P.P., and Kraus, M.H. (1995). Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10, 1813-21.

Allen, N.C., Bagade, S., McQueen, M.B., Ioannidis, J.P., Kavoura, F.K., Khoury, M.J., Tanzi, R.E., and Bertram, L. (2008). Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nature genetics* 40, 827-34.

Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science (New York, NY)* 278, 474-6.

Andrechek, E.R., Hardy, W.R., Girgis-Gabardo, A.A., Perry, R.L., Butler, R., Graham, F.L., Kahn, R.C., Rudnicki, M.A., and Muller, W.J. (2002). ErbB2 is required for muscle spindle and myoblast cell survival. *Molecular and cellular biology* 22, 4714-22.

Axelrod, J., and Tomchick, R. (1958). Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *The Journal of biological chemistry* 233, 702-5.

Balciuniene, J., Feng, N., Iyadurai, K., Hirsch, B., Charnas, L., Bill, B.R., Easterday, M.C., Staaf, J., Oseth, L., Czapansky-Beilman, D., *et al.* (2007). Recurrent 10q22-q23 deletions: a genomic disorder on 10q associated with cognitive and behavioral abnormalities. *American journal of human genetics* 80, 938-47.

Banker, G.A., and Cowan, W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain research* 126, 397-42.

Bargmann, C.I., Hung, M.C., and Weinberg, R.A. (1986). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319, 226-30.

Beare, J.E., Morehouse, J.R., DeVries, W.H., Enzmann, G.U., Burke, D.A., Magnuson, D.S., and Whittemore, S.R. (2009). Gait analysis in normal and spinal contused mice using the TreadScan system. *Journal of neurotrauma* 26, 2045-56.

Beasley, C.L., Zhang, Z.J., Patten, I., and Reynolds, G.P. (2002). Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biological psychiatry* 52, 708-715.

Benzel, I., Bansal, A., Browning, B.L., Galwey, N.W., Maycox, P.R., McGinnis, R., Smart, D., St Clair, D., Yates, P., and Purvis, I. (2007). Interactions among genes in the ErbB-Neuregulin signalling network are associated with increased susceptibility to schizophrenia. *Behav Brain Funct* 3, 31.

Berger, S. L. und Kimmel, A. R. (1987). *Guide To Molecular Cloning Techniques*. Academic Press, San Diego, CA, USA. ISBN: 0-12-181775-X

Bertram, I., Bernstein, H.G., Lendeckel, U., Bukowska, A., Dobrowolny, H., Keilhoff, G., Kanakis, D., Mawrin, C., Bielau, H., Falkai, P., *et al.* (2007). Immunohistochemical evidence for impaired neuregulin-1 signaling in the prefrontal cortex in schizophrenia and in unipolar depression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1096, 147-56.

Birchmeier, C. (2009). ErbB receptors and the development of the nervous system. *Experimental cell research* 315, 611-8.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-23.

Brinkmann, B.G., Agarwal, A., Sereda, M.W., Garratt, A.N., Muller, T., Wende, H., Stassart, R.M., Nawaz, S., Humml, C., Velanac, V., *et al.* (2008). Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59, 581-595.

Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., and Riethmacher, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes & development* 12, 1825-1836.

Buac, K., Watkins-Chow, D.E., Loftus, S.K., Larson, D.M., Incao, A., Gibney, G., and Pavan, W.J. (2008). A Sox10 expression screen identifies an amino acid essential for Erbb3 function. *PLoS genetics* 4, e1000177.

Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Current opinion in genetics & development* 16, 525-32.

Buonanno, A., and Fischbach, G.D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 11, 287-96.

Burden, S., and Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18, 847-55.

Burden, S.J. (1998). The formation of neuromuscular synapses. *Genes & development* 12, 133-48.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., *et al.* (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28, 264-78.

Chance, S.A., Walker, M., and Crow, T.J. (2005). Reduced density of calbindin-immunoreactive interneurons in the planum temporale in schizophrenia. *Brain research*

1046, 32-37.

Chao, H.T., Chen, H., Samaco, R.C., Xue, M., Chahrour, M., Yoo, J., Neul, J.L., Gong, S., Lu, H.C., Heintz, N., *et al.* (2010). Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 468, 263-9.

Chen, P.L., Avramopoulos, D., Lasseter, V.K., McGrath, J.A., Fallin, M.D., Liang, K.Y., Nestadt, G., Feng, N., Steel, G., Cutting, A.S., *et al.* (2009). Fine mapping on chromosome 10q22-q23 implicates Neuregulin 3 in schizophrenia. *American journal of human genetics* 84, 21-34.

Chen, X., Levkowitz, G., Tzahar, E., Karunakaran, D., Lavi, S., Ben-Baruch, N., Leitner, O., Ratzkin, B.J., Bacus, S.S., and Yarden, Y. (1996). An immunological approach reveals biological differences between the two NDF/hereregulin receptors, ErbB-3 and ErbB-4. *The Journal of biological chemistry* 271, 7620-9.

Chen, Y.J., Zhang, M., Yin, D.M., Wen, L., Ting, A., Wang, P., Lu, Y.S., Zhu, X.H., Li, S.J., Wu, C.Y., *et al.* (2010). ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21818-23.

Cheret, C., Willem, M., Fricker, F.R., Wende, H., Wulf-Goldenberg, A., Tahirovic, S., Nave, K.A., Saftig, P., Haass, C., Garratt, A.N., *et al.* (2013). Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. *The EMBO journal* 32, 2015-28.

Coughenour, L.L., McLean, J.R., and Parker, R.B. (1977). A new device for the rapid measurement of impaired motor function in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 6, 351-3.

Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., *et al.* (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science (New York, NY)* 230, 1132-9.

Crone, S.A., Zhao, Y.Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K.L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G., *et al.* (2002). ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nature medicine* 8, 459-65.

Culouscou, J.M., Plowman, G.D., Carlton, G.W., Green, J.M., and Shoyab, M. (1993). Characterization of a breast cancer cell differentiation factor that specifically activates the HER4/p180erbB4 receptor. *The Journal of biological chemistry* 268, 18407-10.

Deakin, I.H., Nissen, W., Law, A.J., Lane, T., Kanso, R., Schwab, M.H., Nave, K.A., Lamsa, K.P., Paulsen, O., Bannerman, D.M., *et al.* (2012). Transgenic overexpression of the type I isoform of neuregulin 1 affects working memory and hippocampal oscillations but not long-term potentiation. *Cereb Cortex* 22, 1520-9.

DeFelipe, J. (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of

cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of chemical neuroanatomy* 14, 1-19.

Del Pino, I., Garcia-Frigola, C., Dehorter, N., Brotons-Mas, J.R., Alvarez-Salvado, E., Martinez de Lagran, M., Ciceri, G., Gabaldon, M.V., Moratal, D., Dierssen, M., *et al.* (2013). ErbB4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron* 79, 1152-1168.

Dougall, W.C., Qian, X., Peterson, N.C., Miller, M.J., Samanta, A., and Greene, M.I. (1994). The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene* 9, 2109-23.

Erickson, S.L., O'Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H., and Moore, M.W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development (Cambridge, England)* 124, 4999-5011.

Ernfors, P., Lee, K.F., and Jaenisch, R. (1994). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147-50.

Fallin, M.D., Lasseter, V.K., Wolyniec, P.S., McGrath, J.A., Nestadt, G., Valle, D., Liang, K.Y., and Pulver, A.E. (2003). Genomewide linkage scan for schizophrenia susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families shows evidence of linkage on chromosome 10q22. *American journal of human genetics* 73, 601-11.

Falls, D.L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental cell research* 284, 14-30.

Faraone, S.V., Hwu, H.G., Liu, C.M., Chen, W.J., Tsuang, M.M., Liu, S.K., Shieh, M.H., Hwang, T.J., Ou-Yang, W.C., Chen, C.Y., *et al.* (2006). Genome scan of Han Chinese schizophrenia families from Taiwan: confirmation of linkage to 10q22.3. *The American journal of psychiatry* 163, 1760-6.

Farinas, I., Jones, K.R., Backus, C., Wang, X.Y., and Reichardt, L.F. (1994). Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* 369, 658-61.

Fazzari, P. (2009). Transcription factors make a turn into migration. *Cell adhesion & migration* 3, 1-2.

Fazzari, P., Paternain, A.V., Valiente, M., Pla, R., Lujan, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marin, O., and Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464, 1376-80.

Fisahn, A., Neddens, J., Yan, L., and Buonanno, A. (2009). Neuregulin-1 modulates hippocampal gamma oscillations: implications for schizophrenia. *Cereb Cortex* 19, 612-8.

Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C.,

Franklin, K., and Paxinos, G. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Third Edition (San Diego, CA: Academic Press).

Rubenstein, J.L., and Marin, O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44, 251-61.

Fox, I.J., and Kornblum, H.I. (2005). Developmental profile of ErbB receptors in murine central nervous system: implications for functional interactions. *Journal of neuroscience research* 79, 584-97.

Galanopoulou, A.S. (2012). Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy. *Pflugers Arch* 460, 505-23.

Garratt, A.N. (2006). "To erb-B or not to erb-B..." Neuregulin-1/ErbB signaling in heart development and function. *Journal of molecular and cellular cardiology* 41, 215-218.

Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-4.

Ghanem, N., Yu, M., Long, J., Hatch, G., Rubenstein, J.L., and Ekker, M. (2007). Distinct cis-regulatory elements from the *Dlx1/Dlx2* locus mark different progenitor cell populations in the ganglionic eminences and different subtypes of adult cortical interneurons. *J Neurosci* 27, 5012-5022.

Gilmour, L.M., Macleod, K.G., McCaig, A., Gullick, W.J., Smyth, J.F., and Langdon, S.P. (2001). Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. *Cancer research* 61, 2169-76.

Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., and Hynes, N.E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO journal* 16, 1647-55.

Grossmann, K.S., Wende, H., Paul, F.E., Cheret, C., Garratt, A.N., Zurborg, S., Feinberg, K., Besser, D., Schulz, H., Peles, E., et al. (2009). The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) directs Neuregulin-1/ErbB signaling throughout Schwann cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16704-16709

Happe, F., Ronald, A., and Plomin, R. (2006). Time to give up on a single explanation for autism. *Nature neuroscience* 9, 1218-20.

Harrison, P.J., and Law, A.J. (2006). Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biological psychiatry* 60, 132-40.

Harrison, P.J., and Weinberger, D.R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular psychiatry* 10, 40-68; image 5.

Hashimoto, R., Straub, R.E., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., and Weinberger, D.R. (2004). Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Molecular psychiatry* 9, 299-307.

Hayes, N.V., and Gullick, W.J. (2008). The neuregulin family of genes and their multiple splice variants in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 13, 205-14.

Helbig, I., Scheffer, I.E., Mulley, J.C., and Berkovic, S.F. (2008). Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet neurology* 7, 231-45.

Hildebrand, M.S., Dahl, H.H., Damiano, J.A., Smith, R.J., Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (2013). Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. *Journal of medical genetics* 50, 271-9.

Hippenmeyer, S., Shneider, N.A., Birchmeier, C., Burden, S.J., Jessell, T.M., and Arber, S. (2002). A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. *Neuron* 36, 1035-49.

Holbro, T., Beerli, R.R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C.F., 3rd, and Hynes, N.E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8933-8.

Hopman, A.H., Ramaekers, F.C., and Speel, E.J. (1998). Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for In situ hybridization using CARD amplification. *J Histochem Cytochem* 46, 771-777.

Huang, Y.Z., Won, S., Ali, D.W., Wang, Q., Tanowitz, M., Du, Q.S., Pelkey, K.A., Yang, D.J., Xiong, W.C., Salter, M.W., *et al.* (2000). Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron* 26, 443-55.

Huang, Z. (2009). Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Molecular and cellular neurosciences* 42, 11-22.

Hynes, N.E., and Stern, D.F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1198, 165-84.

Innis, M. A., Gelfand, D. H. und Sninsky, J. J. (1989). *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA. ISBN-13: 978-0123721815

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-8.

Jinno, S., Aika, Y., Fukuda, T., and Kosaka, T. (1998). Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical disector using confocal laser scanning microscope. *Brain research* 814, 55-70.

Jones, J.T., Akita, R.W., and Sliwkowski, M.X. (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS letters* 447, 227-31.

Kao, W.T., Wang, Y., Kleinman, J.E., Lipska, B.K., Hyde, T.M., Weinberger, D.R., and Law, A.J. (2010). Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15619-15624.

Kaufman, Matthew H. (1992). *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press, San Diego, CA, USA. ISBN-10 0124020356

Kjeldsen, M.J., Corey, L.A., Christensen, K., and Friis, M.L. (2003). Epileptic seizures and syndromes in twins: the importance of genetic factors. *Epilepsy research* 55, 137-46.

Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science (New York, NY)* 321, 53-7.

Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Silbernagl, Stefan (2005). *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, Stuttgart. ISBN 3-13-796003-7

Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., and Aaronson, S.A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9193-7.

Krivosheya, D., Tapia, L., Levinson, J.N., Huang, K., Kang, Y., Hines, R., Ting, A.K., Craig, A.M., Mei, L., Bamji, S.X., *et al.* (2008). ErbB4-neuregulin signaling modulates synapse development and dendritic arborization through distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 283, 32944-56.

Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19, 7881-8.

Law, A.J., Lipska, B.K., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Straub, R.E., Hashimoto, R., Harrison, P.J., Kleinman, J.E., and Weinberger, D.R. (2006). Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6747-52.

Lazzaro, D., Price, M., de Felice, M., and Di Lauro, R. (1991). The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development (Cambridge, England)* 113, 1093-104.

Le Magueresse, C., and Monyer, H. (2013). GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron* 77, 388-405.

Lee, H., and Maihle, N.J. (1998). Isolation and characterization of four alternate c-erbB3 transcripts expressed in ovarian carcinoma-derived cell lines and normal human tissues. *Oncogene* *16*, 3243-52.

Leu, M., Bellmunt, E., Schwander, M., Farinas, I., Brenner, H.R., and Muller, U. (2003). ErbB2 regulates neuromuscular synapse formation and is essential for muscle spindle development. *Development (Cambridge, England)* *130*, 2291-301.

Li, B., Woo, R.S., Mei, L., and Malinow, R. (2007). The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* *54*, 583-97.

Li, H., Chou, S.J., Hamasaki, T., Perez-Garcia, C.G., and O'Leary, D.D. (2012). Neuregulin repellent signaling via ErbB4 restricts GABAergic interneurons to migratory paths from ganglionic eminence to cortical destinations. *Neural development* *7*, 10.

Li, S.J., Wu, C.Y., et al. (2010). ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 21818-21823.

Liu, X., Bates, R., Yin, D.M., Shen, C., Wang, F., Su, N., Kirov, S.A., Luo, Y., Wang, J.Z., Xiong, W.C., et al. (2013). Specific regulation of NRG1 isoform expression by neuronal activity. *J Neurosci* *31*, 8491-501.

Long, W., Wagner, K.U., Lloyd, K.C., Binart, N., Shillingford, J.M., Hennighausen, L., and Jones, F.E. (2003). Impaired differentiation and lactational failure of ErbB4-deficient mammary glands identify ERBB4 as an obligate mediator of STAT5. *Development (Cambridge, England)* *130*, 5257-68.

Long, Y.C., Cheng, Z., Copps, K.D., and White, M.F. (2011). Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways. *Molecular and cellular biology* *31*, 430-41.

Ma, L., Huang, Y.Z., Pitcher, G.M., Valtschanoff, J.G., Ma, Y.H., Feng, L.Y., Lu, B., Xiong, W.C., Salter, M.W., Weinberg, R.J., et al. (2003). Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci* *23*, 3164-75.

Ma, Y.J., Hill, D.F., Creswick, K.E., Costa, M.E., Cornea, A., Lioubin, M.N., Plowman, G.D., and Ojeda, S.R. (1999). Neuregulins signaling via a glial erbB-2-erbB-4 receptor complex contribute to the neuroendocrine control of mammalian sexual development. *J Neurosci* *19*, 9913-27.

Magno, L., Oliveira, M.G., Mucha, M., Rubin, A.N., and Kessar, N. (2012). Multiple embryonic origins of nitric oxide synthase-expressing GABAergic neurons of the neocortex. *Frontiers in neural circuits* *6*, 65.

Maier, A. (1997). Development and regeneration of muscle spindles in mammals and birds. *The International journal of developmental biology* *41*, 1-17.

Marin, O., and Rubenstein, J.L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annual review of neuroscience* 26, 441-83.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews* 5, 793-807.

Massague, J., and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annual review of biochemistry* 62, 515-41.

Meier, J., and Grantyn, R. (2004). A gephyrin-related mechanism restraining glycine receptor anchoring at GABAergic synapses. *J Neurosci* 24, 1398-405.

Meyer, D., and Birchmeier, C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386-90.

Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H., and Nave, K.A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science (New York, NY)* 304, 700-703.

Neddens, J., and Buonanno, A. (2010). Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice. *Hippocampus* 20, 724-44.

Nery, S., Fishell, G., and Corbin, J.G. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nature neuroscience* 5, 1279-87.

Nobrega-Pereira, S., Kessar, N., Du, T., Kimura, S., Anderson, S.A., and Marin, O. (2008). Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59, 733-45.

Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., and Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* 1, 2005 0010.

Okabe, S., Miwa, A., and Okado, H. (2001). Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21, 6105-14.

Olayioye, M.A. (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 3, 385-9.

Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal* 19, 3159-67.

Ozcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., Hubner, N., Chien, K.R., Birchmeier, C., and Garratt, A.N. (2002). Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8880-5.

Picchioni, M.M., and Murray, R.M. (2007). Schizophrenia. *BMJ (Clinical research ed)* 335, 91-5.

Pleasure, S.J., Anderson, S., Hevner, R., Bagri, A., Marin, O., Lowenstein, D.H., and Rubenstein, J.L. (2000). Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28, 727-40.

Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., and Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1746-50.

Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., and Rubenstein, J.L. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *The Journal of comparative neurology* 424, 409-38.

Pyott, S.J., and Rosenmund, C. (2002). The effects of temperature on vesicular supply and release in autaptic cultures of rat and mouse hippocampal neurons. *The Journal of physiology* 539, 523-35.

Qian, X., Dougall, W.C., Hellman, M.E., and Greene, M.I. (1994). Kinase-deficient neu proteins suppress epidermal growth factor receptor function and abolish cell transformation. *Oncogene* 9, 1507-14.

Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R., and Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725-30.

Rohrbach, S., Yan, X., Weinberg, E.O., Hasan, F., Bartunek, J., Marchionni, M.A., and Lorell, B.H. (1999). Neuregulin in cardiac hypertrophy in rats with aortic stenosis. Differential expression of erbB2 and erbB4 receptors. *Circulation* 100, 407-12.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, NY)* 230, 1350-4.

Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA. ISBN: 0879695773

Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisante-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., *et al.* (2002). A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *American journal of human genetics* 71, 1296-302.

Shimamura, A.P. (1995). Memory and the prefrontal cortex. *Annals of the New York*

Academy of Sciences 769, 151-9.

Shintani, S., Funayama, T., Yoshihama, Y., Alcalde, R.E., and Matsumura, T. (1995a). Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer letters* 95, 79-83.

Shintani, S., Funayama, T., Yoshihama, Y., Alcalde, R.E., Ootsuki, K., Terakado, N., and Matsumura, T. (1995b). Expression of c-erbB family gene products in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: an immunohistochemical study. *Anticancer research* 15, 2623-6.

Simpson, E.H., Kellendonk, C., and Kandel, E. (2010). A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron* 65, 585-96.

Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702.

Stefansson, H., Sarginson, J., Kong, A., Yates, P., Steinthorsdottir, V., Gudfinnsson, E., Gunnarsdottir, S., Walker, N., Petursson, H., Crombie, C., *et al.* (2003). Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *American journal of human genetics* 72, 83-7.

Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T.T., *et al.* (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American journal of human genetics* 71, 877-92.

Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., and Rubenstein, J.L. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development (Cambridge, England)* 126, 3359-70.

Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., and Kaneko, T. (2003). Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *The Journal of comparative neurology* 467, 60-79.

Tan, G.H., Liu, Y.Y., Hu, X.L., Yin, D.M., Mei, L., and Xiong, Z.Q. (2011). Neuregulin 1 represses limbic epileptogenesis through ErbB4 in parvalbumin-expressing interneurons. *Nature neuroscience* 15, 258-66.

ollo, L., Vogel, K.S., Palko, M.E., Reid, S.W., and Parada, L.F. (1994). Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11844-8.

Tidcombe, H., Jackson-Fisher, A., Mathers, K., Stern, D.F., Gassmann, M., and Golding, J.P. (2003). Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America *100*, 8281-6.

Ting, A.K., Chen, Y., Wen, L., Yin, D.M., Shen, C., Tao, Y., Liu, X., Xiong, W.C., and Mei, L. (2011). Neuregulin 1 promotes excitatory synapse development and function in GABAergic interneurons. *J Neurosci* *31*, 15-25.

Tourtellotte, W.G., and Milbrandt, J. (1998). Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. *Nature genetics* *20*, 87-91.

Tricoire, L., and Vitalis, T. (2012). Neuronal nitric oxide synthase expressing neurons: a journey from birth to neuronal circuits. *Frontiers in neural circuits* *6*, 82.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., *et al.* (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* *309*, 418-25.

Veikkolainen, V., Naillat, F., Railo, A., Chi, L., Manninen, A., Hohenstein, P., Hastie, N., Vainio, S., and Elenius, K. (2012). ErbB4 modulates tubular cell polarity and lumen diameter during kidney development. *J Am Soc Nephrol* *23*, 112-22.

Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *76*, 615-9.

Vullhorst, D., Neddens, J., Karavanova, I., Tricoire, L., Petralia, R.S., McBain, C.J., and Buonanno, A. (2009). Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus. *J Neurosci* *29*, 12255-64.

Walro, J.M., and Kucera, J. (1999). Why adult mammalian intrafusal and extrafusal fibers contain different myosin heavy-chain isoforms. *Trends in neurosciences* *22*, 180-4.

Wang, K., Zhang, H., Ma, D., Bucan, M., Glessner, J.T., Abrahams, B.S., Salyakina, D., Imielinski, M., Bradfield, J.P., Sleiman, P.M., *et al.* (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* *459*, 528-33.

Weickert, C.S., Tiwari, Y., Schofield, P.R., Mowry, B.J., and Fullerton, J.M. (2012). Schizophrenia-associated HapICE haplotype is associated with increased NRG1 type III expression and high nucleotide diversity. *Translational psychiatry* *2*, e104.

Wen, L., Lu, Y.S., Zhu, X.H., Li, X.M., Woo, R.S., Chen, Y.J., Yin, D.M., Lai, C., Terry, A.V., Jr., Vazdarjanova, A., *et al.* (2010). Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 1211-6.

Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian

basal forebrain. *Development (Cambridge, England)* 128, 3759-71.

Wigmore, P.M., and Evans, D.J. (2002). Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *International review of cytology* 216, 175-232.

Yarden, Y., and Schlessinger, J. (1987). Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26, 1443-51.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-37.

Yau, H.J., Wang, H.F., Lai, C., and Liu, F.C. (2003). Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13, 252-64.

Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., *et al.* (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171-178.

Yozu, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2005). The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J Neurosci* 25, 7268-77.

Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., and Godowski, P.J. (1997). Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9562-7.

Zhao, Y.Y., Sawyer, D.R., Baliga, R.R., Opel, D.J., Han, X., Marchionni, M.A., and Kelly, R.A. (1998). Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *The Journal of biological chemistry* 273, 10261-9.

Zhu, X., Lai, C., Thomas, S., and Burden, S.J. (1995). Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. *The EMBO journal* 14, 5842-8.

Anhang

a. Einstellungen des LSM-Mikroskops für die Analyse synaptischer Proteine

Tabelle 1 LSM-Parameter: Wert

Image Width:	2048
Image Height:	2048
Number of channels:	3
Z Stack size:	3
Time Stack size:	1
Scan Type	Normal X-Y-Z scan
Voxel X size	0.08 μm
Voxel Y size	0.08 μm
Voxel Z size	0.40 μm
Objective	Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27
X Zoom factor	1.00
Y Zoom factor	1.00
Z Zoom factor	1.00
Plane width	0.00 μm
Plane height	0.00 μm
Volume depth	0.00 μm
Plane spacing	400000.00 μm

b. Beispiel-Pipeline zur Quantifizierung und Analyse synaptischer Proteine

Tabelle 2 pipeline.cp

CellProfiler Pipeline: <http://www.cellprofiler.org>
 Version:1
 SVNRevision:11710

LoadImages:[module_num:1|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:11|show_window:False|notes:\x5B\x5D]
 File type to be loaded:individual images
 File selection method:Text-Exact match
 Number of images in each group?:3
 Type the text that the excluded images have in common:Do not use
 Analyze all subfolders within the selected folder?:None
 Input image file location:Default Input Folder\x7CNone
 Check image sets for missing or duplicate files?:Yes
 Group images by metadata?:No
 Exclude certain files?:No
 Specify metadata fields to group by:

Select subfolders to analyze:
Image count:4
Text that these images have in common (case-sensitive):C2
Position of this image in each group:1
Extract metadata from where?:None
Regular expression that finds metadata in the file name:^(?P<Plate>.*)_(?P<Well>\x5BA-P\x5D\x5B0-9\x5D{2})_s(?P<Site>\x5B0-9\x5D)
Type the regular expression that finds metadata in the subfolder
path:.*\x5B\\\x5D(?P<Date>.*)\x5B\\\x5D(?P<Run>.*)\$
Channel count:1
Group the movie frames?:No
Grouping method:Interleaved
Number of channels per group:3
Load the input as images or objects?:Images
Name this loaded image:vGlut1
Name this loaded object:Nuclei
Retain outlines of loaded objects?:No
Name the outline image:LoadedImageOutlines
Channel number:1
Rescale intensities?:No
Text that these images have in common (case-sensitive):C3
Position of this image in each group:2
Extract metadata from where?:None
Regular expression that finds metadata in the file name:^(?P<Plate>.*)_(?P<Well>\x5BA-P\x5D\x5B0-9\x5D{2})_s(?P<Site>\x5B0-9\x5D)
Type the regular expression that finds metadata in the subfolder
path:.*\x5B\\\x5D(?P<Date>.*)\x5B\\\x5D(?P<Run>.*)\$
Channel count:1
Group the movie frames?:No
Grouping method:Interleaved
Number of channels per group:3
Load the input as images or objects?:Images
Name this loaded image:PSD-95
Name this loaded object:Nuclei
Retain outlines of loaded objects?:No
Name the outline image:LoadedImageOutlines
Channel number:1
Rescale intensities?:No
Text that these images have in common (case-sensitive):dendrit
Position of this image in each group:4
Extract metadata from where?:None
Regular expression that finds metadata in the file name:^(?P<Plate>.*)_(?P<Well>\x5BA-P\x5D\x5B0-9\x5D{2})_s(?P<Site>\x5B0-9\x5D)
Type the regular expression that finds metadata in the subfolder
path:.*\x5B\\\x5D(?P<Date>.*)\x5B\\\x5D(?P<Run>.*)\$
Channel count:1
Group the movie frames?:No

Grouping method:Interleaved
 Number of channels per group:3
 Load the input as images or objects?:Images
 Name this loaded image:GABA_cell
 Name this loaded object:Nuclei
 Retain outlines of loaded objects?:No
 Name the outline image:LoadedImageOutlines
 Channel number:1
 Rescale intensities?:Yes
 Text that these images have in common (case-sensitive):C1
 Position of this image in each group:4
 Extract metadata from where?:None
 Regular expression that finds metadata in the file name:^(?P<Plate>.*)(?P<Well>\x5B-\x5D\x5B0-9\x5D{2})_s(?P<Site>\x5B0-9\x5D)
 Type the regular expression that finds metadata in the subfolder
 path:.*\x5B\\\x5D(?P<Date>.*)\x5B\\\x5D(?P<Run>.*)\$
 Channel count:1
 Group the movie frames?:No
 Grouping method:Interleaved
 Number of channels per group:3
 Load the input as images or objects?:Images
 Name this loaded image:ErbB4
 Name this loaded object:Nuclei
 Retain outlines of loaded objects?:No
 Name the outline image:LoadedImageOutlines
 Channel number:1
 Rescale intensities?:Yes

ApplyThreshold:[module_num:2|svn_version:\'6746\'|variable_revision_number:5|show_window:False|notes:\x5B\x5D]
 Select the input image:GABA_cell
 Name the output image:GABA_bin
 Select the output image type:Binary (black and white)
 Set pixels below or above the threshold to zero?:Below threshold
 Subtract the threshold value from the remaining pixel intensities?:No
 Number of pixels by which to expand the thresholding around those excluded bright pixels:0.0
 Select the thresholding method:Manual
 Manual threshold:0.4
 Lower and upper bounds on threshold:0.000000,1.000000
 Threshold correction factor:1
 Approximate fraction of image covered by objects?:0.01
 Select the input objects:None
 Two-class or three-class thresholding?:Two classes
 Minimize the weighted variance or the entropy?:Weighted variance
 Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?:Foreground

Select the measurement to threshold with:None

ApplyThreshold:[module_num:3|svn_version:\'6746\'|variable_revision_number:5|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the input image:vGlut1

Name the output image:vGlut1_thr

Select the output image type:Binary (black and white)

Set pixels below or above the threshold to zero?:Below threshold

Subtract the threshold value from the remaining pixel intensities?:No

Number of pixels by which to expand the thresholding around those excluded bright pixels:0.0

Select the thresholding method:Manual

Manual threshold:0.25

Lower and upper bounds on threshold:0.000000,1.000000

Threshold correction factor:1

Approximate fraction of image covered by objects?:0.01

Select the input objects:None

Two-class or three-class thresholding?:Two classes

Minimize the weighted variance or the entropy?:Weighted variance

Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?:Foreground

Select the measurement to threshold with:None

ApplyThreshold:[module_num:4|svn_version:\'6746\'|variable_revision_number:5|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the input image:PSD-95

Name the output image:PSD-95_thr

Select the output image type:Binary (black and white)

Set pixels below or above the threshold to zero?:Below threshold

Subtract the threshold value from the remaining pixel intensities?:No

Number of pixels by which to expand the thresholding around those excluded bright pixels:0.0

Select the thresholding method:Manual

Manual threshold:0.25

Lower and upper bounds on threshold:0.000000,1.000000

Threshold correction factor:1

Approximate fraction of image covered by objects?:0.01

Select the input objects:None

Two-class or three-class thresholding?:Two classes

Minimize the weighted variance or the entropy?:Weighted variance

Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?:Foreground

Select the measurement to threshold with:None

ApplyThreshold:[module_num:5|svn_version:\'6746\'|variable_revision_number:5|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the input image:ErbB4

Name the output image:ErbB4-Thresh
 Select the output image type:Grayscale
 Set pixels below or above the threshold to zero?:Below threshold
 Subtract the threshold value from the remaining pixel intensities?:No
 Number of pixels by which to expand the thresholding around those excluded bright pixels:0.0
 Select the thresholding method:Manual
 Manual threshold:0.5
 Lower and upper bounds on threshold:0.000000,1.000000
 Threshold correction factor:1
 Approximate fraction of image covered by objects?:0.01
 Select the input objects:None
 Two-class or three-class thresholding?:Two classes
 Minimize the weighted variance or the entropy?:Weighted variance
 Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?:Foreground
 Select the measurement to threshold with:None

IdentifyPrimaryObjects:[module_num:6|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:8|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the input image:ErbB4-Thresh
 Name the primary objects to be identified:ErbB4_1
 Typical diameter of objects, in pixel units (Min,Max):5,55
 Discard objects outside the diameter range?:Yes
 Try to merge too small objects with nearby larger objects?:No
 Discard objects touching the border of the image?:Yes
 Select the thresholding method:Otsu Adaptive
 Threshold correction factor:1
 Lower and upper bounds on threshold:0.000000,1.000000
 Approximate fraction of image covered by objects?:0.01
 Method to distinguish clumped objects:Intensity
 Method to draw dividing lines between clumped objects:Intensity
 Size of smoothing filter:10
 Suppress local maxima that are closer than this minimum allowed distance:7
 Speed up by using lower-resolution image to find local maxima?:No
 Name the outline image:PrimaryOutlines
 Fill holes in identified objects?:Yes
 Automatically calculate size of smoothing filter?:Yes
 Automatically calculate minimum allowed distance between local maxima?:Yes
 Manual threshold:0.0
 Select binary image:None
 Retain outlines of the identified objects?:No
 Automatically calculate the threshold using the Otsu method?:Yes
 Enter Laplacian of Gaussian threshold:0.5
 Two-class or three-class thresholding?:Two classes
 Minimize the weighted variance or the entropy?:Weighted variance
 Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the

background?:Foreground

Automatically calculate the size of objects for the Laplacian of Gaussian filter?:Yes

Enter LoG filter diameter:5

Handling of objects if excessive number of objects identified:Continue

Maximum number of objects:500

Select the measurement to threshold with:None

IdentifyPrimaryObjects:[module_num:7|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:8|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the input image:PSD-95_thr

Name the primary objects to be identified:PSD-p

Typical diameter of objects, in pixel units (Min,Max):5,55

Discard objects outside the diameter range?:Yes

Try to merge too small objects with nearby larger objects?:No

Discard objects touching the border of the image?:Yes

Select the thresholding method:Otsu Adaptive

Threshold correction factor:1

Lower and upper bounds on threshold:0.000000,1.000000

Approximate fraction of image covered by objects?:0.01

Method to distinguish clumped objects:Shape

Method to draw dividing lines between clumped objects:Shape

Size of smoothing filter:7

Suppress local maxima that are closer than this minimum allowed distance:3

Speed up by using lower-resolution image to find local maxima?:No

Name the outline image:PrimaryPSD-puncta

Fill holes in identified objects?:No

Automatically calculate size of smoothing filter?:No

Automatically calculate minimum allowed distance between local maxima?:No

Manual threshold:0.35

Select binary image:None

Retain outlines of the identified objects?:No

Automatically calculate the threshold using the Otsu method?:Yes

Enter Laplacian of Gaussian threshold:0.5

Two-class or three-class thresholding?:Two classes

Minimize the weighted variance or the entropy?:Weighted variance

Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the

background?:Foreground

Automatically calculate the size of objects for the Laplacian of Gaussian filter?:Yes

Enter LoG filter diameter:5

Handling of objects if excessive number of objects identified:Continue

Maximum number of objects:500

Select the measurement to threshold with:None

IdentifyPrimaryObjects:[module_num:8|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:8|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the input image:vGLut1_thr

Name the primary objects to be identified:vGlut1-p

Typical diameter of objects, in pixel units (Min,Max):5,55
Discard objects outside the diameter range?:Yes
Try to merge too small objects with nearby larger objects?:No
Discard objects touching the border of the image?:Yes
Select the thresholding method:Otsu Adaptive
Threshold correction factor:1
Lower and upper bounds on threshold:0.000000,1.000000
Approximate fraction of image covered by objects?:0.01
Method to distinguish clumped objects:Shape
Method to draw dividing lines between clumped objects:Shape
Size of smoothing filter:7
Suppress local maxima that are closer than this minimum allowed distance:3
Speed up by using lower-resolution image to find local maxima?:No
Name the outline image:PrimaryOutlines
Fill holes in identified objects?:No
Automatically calculate size of smoothing filter?:No
Automatically calculate minimum allowed distance between local maxima?:No
Manual threshold:0.35
Select binary image:Synapse
Retain outlines of the identified objects?:No
Automatically calculate the threshold using the Otsu method?:Yes
Enter Laplacian of Gaussian threshold:0.5
Two-class or three-class thresholding?:Two classes
Minimize the weighted variance or the entropy?:Weighted variance
Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?:Foreground
Automatically calculate the size of objects for the Laplacian of Gaussian filter?:Yes
Enter LoG filter diameter:5
Handling of objects if excessive number of objects identified:Continue
Maximum number of objects:500
Select the measurement to threshold with:None

MaskObjects:[module_num:9|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]
Select objects to be masked:ErbB4_1
Name the masked objects:ErbB4_Masked
Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Image
Select the masking object(s):None
Select the masking image:GABA_bin
Handling of objects that are partially masked:Keep overlapping region
Fraction of object that must overlap:0.5
Numbering of resulting objects:Renummer
Retain outlines of the resulting objects?:Yes
Name the outline image:Masked_ErbB4
Invert the mask?:No

OverlayOutlines:[module_num:10|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|s

how_window:False|notes:\x5B\x5D]

Display outlines on a blank image?:No
Select image on which to display outlines:ErbB4
Name the output image:ErbB4_Puncta
Select outline display mode:Color
Select method to determine brightness of outlines:Max of image
Width of outlines:1
Select outlines to display:Masked_ErbB4
Select outline color:Red

MaskObjects:[module_num:11|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\'\x5D]

Select objects to be masked:PSD-p
Name the masked objects:PSD-pu
Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Image
Select the masking object(s):None
Select the masking image:GABA_bin
Handling of objects that are partially masked:Keep
Fraction of object that must overlap:0.5
Numbering of resulting objects:Renumber
Retain outlines of the resulting objects?:Yes
Name the outline image:PSD-pu-image
Invert the mask?:No

MaskObjects:[module_num:12|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select objects to be masked:vGlut1-p
Name the masked objects:vGlut1-pu
Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Image
Select the masking object(s):None
Select the masking image:GABA_bin
Handling of objects that are partially masked:Keep
Fraction of object that must overlap:0.5
Numbering of resulting objects:Renumber
Retain outlines of the resulting objects?:Yes
Name the outline image:vGlut1-image
Invert the mask?:No

MaskObjects:[module_num:13|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select objects to be masked:PSD-pu
Name the masked objects:Just-PSD
Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Objects
Select the masking object(s):vGlut1-pu
Select the masking image:vGlut1_thr
Handling of objects that are partially masked:Remove
Fraction of object that must overlap:0.5

Numbering of resulting objects:Renummer
Retain outlines of the resulting objects?:Yes
Name the outline image:Just_PSD
Invert the mask?:Yes

MaskObjects:[module_num:14|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select objects to be masked:PSD-pu
Name the masked objects:overlap3
Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Objects
Select the masking object(s):vGlut-1pu
Select the masking image:None
Handling of objects that are partially masked:Keep
Fraction of object that must overlap:0.5
Numbering of resulting objects:Renummer
Retain outlines of the resulting objects?:Yes
Name the outline image:overlap3
Invert the mask?:No

MaskObjects:[module_num:15|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select objects to be masked:ErbB4_Masked
Name the masked objects:ErbB4+PSD
Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Objects
Select the masking object(s):PSD-pu
Select the masking image:None
Handling of objects that are partially masked:Keep overlapping region
Fraction of object that must overlap:0.5
Numbering of resulting objects:Renummer
Retain outlines of the resulting objects?:Yes
Name the outline image:ErbB4+PSD
Invert the mask?:No

MaskObjects:[module_num:16|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select objects to be masked:ErbB4+PSD
Name the masked objects:ErbB4+overlap
Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Objects
Select the masking object(s):overlap3
Select the masking image:None
Handling of objects that are partially masked:Keep
Fraction of object that must overlap:0.5
Numbering of resulting objects:Renummer
Retain outlines of the resulting objects?:No
Name the outline image:MaskedOutlines
Invert the mask?:No

MaskObjects:[module_num:17|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select objects to be masked:ErbB4+PSD

Name the masked objects:ErbB4PSD-overlap

Mask using a region defined by other objects or by binary image?:Objects

Select the masking object(s):overlap3

Select the masking image:None

Handling of objects that are partially masked:Remove

Fraction of object that must overlap:0.5

Numbering of resulting objects:Renumber

Retain outlines of the resulting objects?:No

Name the outline image:MaskedOutlines

Invert the mask?:Yes

GrayToColor:[module_num:18|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select a color scheme:RGB

Select the input image to be colored red:PSD-95

Select the input image to be colored green:ErbB4+PSD

Select the input image to be colored blue:vGlut1

Name the output image:color

Relative weight for the red image:1

Relative weight for the green image:1

Relative weight for the blue image:1

Select the input image to be colored cyan:Leave this black

Select the input image to be colored magenta:Leave this black

Select the input image to be colored yellow:Leave this black

Select the input image that determines brightness:Leave this black

Relative weight for the cyan image:1

Relative weight for the magenta image:1

Relative weight for the yellow image:1

Relative weight for the brightness image:1

Select the input image to add to the stacked image:None

SaveImages:[module_num:19|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:7|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the type of image to save:Image

Select the image to save:color

Select the objects to save:None

Select the module display window to save:None

Select method for constructing file names:From image filename

Select image name for file prefix:PSD-95

Enter single file name:OrigBlue

Do you want to add a suffix to the image file name?:Yes

Text to append to the image name:_PSD_B4-Puncta_vGlut1

Select file format to use:tif

Output file location:Default Output Folder\x7CNone

Image bit depth:8
Overwrite existing files without warning?:No
Select how often to save:Every cycle
Rescale the images? :No
Save as grayscale or color image?:Grayscale
Select colormap:gray
Store file and path information to the saved image?:No
Create subfolders in the output folder?:No

OverlayOutlines:[module_num:20|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:2|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Display outlines on a blank image?:No
Select image on which to display outlines:color
Name the output image:Psd-color
Select outline display mode:Color
Select method to determine brightness of outlines:Max of image
Width of outlines:1
Select outlines to display:Just_PSD
Select outline color:Red
Select outlines to display:overlap3
Select outline color:Green
Select outlines to display:vGlut1-image
Select outline color:Blue

SaveImages:[module_num:21|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:7|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select the type of image to save:Image
Select the image to save:ErbB4_Puncta
Select the objects to save:None
Select the module display window to save:None
Select method for constructing file names:From image filename
Select image name for file prefix:ErbB4
Enter single file name:OrigBlue
Do you want to add a suffix to the image file name?:No
Text to append to the image name:
Select file format to use:tif
Output file location:Default Output Folder\x7CNone
Image bit depth:8
Overwrite existing files without warning?:No
Select how often to save:Every cycle
Rescale the images? :No
Save as grayscale or color image?:Grayscale
Select colormap:gray
Store file and path information to the saved image?:No
Create subfolders in the output folder?:No

MeasureImageAreaOccupied:[module_num:22|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision

_number:3|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Hidden:1

Measure the area occupied in a binary image, or in objects?:Binary Image

Select objects to measure:None

Retain a binary image of the object regions?:No

Name the output binary image:Stain

Select a binary image to measure:GABA_bin

MeasureObjectSizeShape:[module_num:23|svn_version:\'1\'|variable_revision_number:1|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select objects to measure:PSD-pu

Select objects to measure:vGlut-1pu

Select objects to measure:overlap3

Select objects to measure:Just-PSD

Select objects to measure:ErbB4+overlap

Select objects to measure:ErbB4PSD-overlap

Calculate the Zernike features?:No

MeasureObjectIntensity:[module_num:24|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:3|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Hidden:1

Select an image to measure:PSD-95

Select objects to measure:PSD-pu

Select objects to measure:overlap3

Select objects to measure:Just-PSD

MeasureObjectIntensity:[module_num:25|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:3|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Hidden:1

Select an image to measure:ErbB4

Select objects to measure:PSD-pu

Select objects to measure:overlap3

Select objects to measure:Just-PSD

ExportToSpreadsheet:[module_num:26|svn_version:\'Unknown\'|variable_revision_number:7|show_window:False|notes:\x5B\x5D]

Select or enter the column delimiter:Comma (",")

Prepend the output file name to the data file names?:Yes

Add image metadata columns to your object data file?:Yes

Limit output to a size that is allowed in Excel?:Yes

Select the columns of measurements to export?:Yes

Calculate the per-image mean values for object measurements?:Yes

Calculate the per-image median values for object measurements?:No

Calculate the per-image standard deviation values for object measurements?:No

Output file location:Default Output Folder\x7CNone

Create a GenePattern GCT file?:No

Select source of sample row name:Metadata

Select the image to use as the identifier:None

Select the metadata to use as the identifier:None

Export all measurements, using default file names?:Yes

Press button to select measurements to

export:overlap3\x7CNumber_Object_Number,overlap3\x7CIntensity_MeanIntensity_ErbB4,overlap3\x7CIntensity_MeanIntensity_PSD-

95,overlap3\x7CIntensity_IntegratedIntensity_ErbB4,overlap3\x7CIntensity_IntegratedIntensity_PSD-

95,overlap3\x7CAreaShape_Area,ErbB4_Masked\x7CNumber_Object_Number,Image\x7CCount_overlap3,Image\x7CCount_vGlut-1pu,Image\x7CCount_Just-

PSD,Image\x7CCount_ErbB4+overlap,Image\x7CCount_PSD-pu,Image\x7CCount_ErbB4PSD-overlap,Image\x7CAreaOccupied_AreaOccupied_GABA_bin,Image\x7CFileName_GABA_cell

,Just-PSD\x7CNumber_Object_Number,Just-PSD\x7CIntensity_MeanIntensity_ErbB4,Just-PSD\x7CIntensity_MeanIntensity_PSD-95,Just-

PSD\x7CIntensity_IntegratedIntensity_ErbB4,Just-

PSD\x7CIntensity_IntegratedIntensity_PSD-95,Just-

PSD\x7CAreaShape_Area,ErbB4+overlap\x7CNumber_Object_Number,ErbB4PSD-

overlap\x7CNumber_Object_Number,PSD-pu\x7CNumber_Object_Number,PSD-

pu\x7CIntensity_MeanIntensity_ErbB4,PSD-pu\x7CIntensity_MeanIntensity_PSD-95,PSD-

pu\x7CIntensity_IntegratedIntensity_ErbB4,PSD-pu\x7CIntensity_IntegratedIntensity_PSD-

95,PSD-pu\x7CAreaShape_Area,vGlut-1pu\x7CAreaShape_Area,vGlut-

1pu\x7CNumber_Object_Number,ErbB4+PSD\x7CNumber_Object_Number

Data to export:Do not use

Combine these object measurements with those of the previous object?:No

File name:DATA.csv

Use the object name for the file name?:Yes

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den Schriften wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Außerdem erkläre ich, dass diese Promotion noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt oder veröffentlicht wurde und dass ich solche Veröffentlichungen vor Abschluss der Promotion nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Carmen Birchmeier betreut worden.

Katharina Paulick