

Aus dem
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie / Signaltransduktion in Nerven und
Muskelzellen

Leiterin: Professor Dr. Carmen Birchmeier-Kohler

Habilitationsschrift

Funktionelle Analyse der Neuregulin-1/ErbB Signalkaskade im Herzen und Nervensystem von Säugetieren

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Zellbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Alistair Neil Garratt, M.A. (Cantab), Ph.D.
Geboren am 1.9.1970 in Stourbridge, Großbritannien

Eingereicht: November 2010

Dekanin: Professor Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Kerstin Krieglstein, Universität Freiburg

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Michael Wegner, Universität Erlangen-Nürnberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Die Entdeckung der ErbB Familie	3
1.2 Die Charakterisierung verschiedener Isoformen des ErbB-Liganden Neuregulin-1	4
2. Funktionen von Nrg1/ErbB-Signalen in Vorläufer Schwann'scher Zellen	6
3. Verwendung des Cre- <i>loxP</i> -Systems um spätere Funktionen von Nrg1/ErbB zu eruieren	9
3.1 Nrg1/ErbB-Signale steuern die Myelinisierung der peripheren Nerven	10
3.2 Funktion der Nrg1/ErbB-Signalkaskade in embryonalen und adulten Herzen	14
3.2.1 Konditionelle Inaktivierung von <i>ErbB2</i> führt zur dilatativen Kardiomyopathie	14
3.2.2 Herzfunktion in adulten Mäusen ist von der Menge Nrg1 abhängig	17
4. BACE1-abhängige Proteolyse von Nrg1 reguliert die Myelinisierung des peripheren Nervensystems	19
5. Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktionskette der entwickelnden und myelinisierenden Schwann'schen Zellen	24
6. Diskussion	26
7. Zusammenfassung	37
8. Eigene Arbeiten, die Bestandteil dieser Schrift sind	40
9. Literatur	41
10. Danksagung	47
11. Erklärung	48

1. Einleitung

1.1 Die Entdeckung der ErbB Familie

Die molekulare Charakterisierung viraler Onkogene und ihrer zellulären Homologe, der Protoonkogene, hat unser Verständnis der Mechanismen von zellulärer Proliferation, Migration, Wachstum und Überleben in normalem und malignem Gewebe von Grund auf umgestaltet. Ein Beispiel für ein solches Protoonkogen stellt die Familie der ErbB-Rezeptoren dar, als deren erstes Mitglied der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal-Growth-Factor, EGF) identifiziert wurde. Nach der Isolierung und biochemischen Charakterisierung von EGF durch Stanley Cohen in den 60er und 70er Jahren [7] folgte die Suche nach dem zellulären Rezeptor. Dessen Primärsequenz wurde 1984 veröffentlicht [8]. Sequenzvergleiche zeigten, dass das EGF-Rezeptor-Gen das zelluläre Gegenstück des transformierenden *v-erb-B*-Onkogens aus dem Avian-Erythroblastosis-Virus war. Der EGF-Rezeptor (ErbB1) wurde so zum Gründungsmitglied einer Familie von vier Rezeptortyrosinkinasen, der *ErbB*-Protoonkogene [8, 9]. ErbB2, auch HER2 oder c-neu genannt, wurde zuerst als Onkogen identifiziert, und zeigt eine sehr enge Sequenz-Verwandtschaft zum EGF-Rezeptor ErbB1 [10]. Die Identifizierung zweier weiterer ErbB-Rezeptoren, ErbB3 und ErbB4, wurde durch Sequenzhomologie möglich [11, 12]. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle in der Entstehung und Progression von Krebs wurden Struktur und Aktivität der ErbB-Rezeptoren intensiv untersucht, so dass heute die Mechanismen der ErbB-Rezeptor-Signalübertragung sehr gut verstanden sind [13, 14]. Viel medizinisches Interesse hat sich auf den ErbB2 (HER2) Rezeptor fokussiert, der oft in Tumorgeweben überexprimiert wird: ErbB2 ist das Zielmolekül einer antikörperbasierten Therapie vom metastasierenden Mammakarzinom (Herceptin®/Trastuzumab) [15]. Liganden-Bindung an die extrazelluläre Domäne der ErbB-Rezeptoren führt zur Heteromerisierung der Rezeptoren und aktiviert die intrazellulären Tyrosinkinasen. Aktivierte Rezeptoren phosphorylieren einander an Tyrosinresten, die als Bindungsstellen für nachgeschaltete Enzyme oder Adapterproteine dienen und das Signal im Zellinneren weiterleiten [16, 17]. ErbB-Rezeptoren aktivieren verschiedene Signalkaskaden, darunter die Ras/Mitogen-activated protein (MAP) Kinase/Extracellular-Signal-Regulated-Kinase-1/2 (Erk1/2) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Kaskaden. Zudem mobilisieren sie über Aktivierung von Phospholipase-C- γ Ca^{2+} und beeinflussen so die Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen Protein Kinase C (PKC) sowie NFAT [14]. Die Aktivierung dieser Signalwege führt zu zellulären Antworten wie

Proliferation, Differenzierung und Motilität, und kann das Überleben der Zellen verbessern. Die Signalkaskaden, die den ErbB-Rezeptoren nachgeschaltet sind, wurden primär in kultivierten Fibroblasten oder Epithel- bzw. Karzinomzellen analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen dienen als Musterbeispiele für ErbB-Signalübertragung in anderen Zelltypen.

1.2 Die Charakterisierung verschiedener Isoformen des ErbB-Liganden Neuregulin-1

Am Anfang der 90er Jahre gab es eine intensive Suche nach Liganden, die eine Tyrosinphosphorylierung von ErbB2 induzieren. Parallel wurde an der molekularen Identifizierung eines starken mitogenen Faktors für Schwann'sche Zellen gearbeitet, der erstmals in Extrakten der Rinderhypophyse von Raff und Mitarbeiter/innen beschrieben worden war [18]. Diese voneinander unabhängigen Untersuchungen führten zur Identifizierung verschiedener Isoformen von Neuregulin-1 (Nrg1), einem EGF-ähnlichen Wachstums- und Differenzierungs-Faktor, der mit hoher Affinität an ErbB3 und ErbB4 Rezeptoren bindet [19, 20]. Es konnte gezeigt werden, dass der ErbB2 Rezeptor keinen der bekannten ErbB Liganden direkt bindet. Allerdings wird ErbB2 nach Bindung von Nrg1 durch Heteromerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie aktiviert und phosphoryliert.

Neureguline (Nrg1-4) bilden eine Familie extrazellulärer Faktoren, die durch ErbB Rezeptoren Signale übertragen. Alle vier Mitglieder der Familie besitzen eine EGF-ähnliche Domäne, die für Rezeptorbindung und Aktivierung verantwortlich ist [14, 21]. Der Prototyp und das am besten untersuchte Mitglied der Familie ist Nrg1, das von einem der größten Gene in Säugern kodiert wird. Von diesem *Nrg1*-Gen werden verschiedene Isoformen abgelesen; die mRNAs, die für die Isoformen kodieren, werden von verschiedenen Promotoren transkribiert. Alternatives Spleißen steuert zu ihrer Heterogenität bei [19]. In Menschen und anderen Primaten sollen sechs unterschiedliche Subtypen von Nrg1 Isoformen existieren, und Typ IV Nrg1 scheint nur in Primaten, aber nicht in anderen Säugern exprimiert zu werden (Abbildung 1).

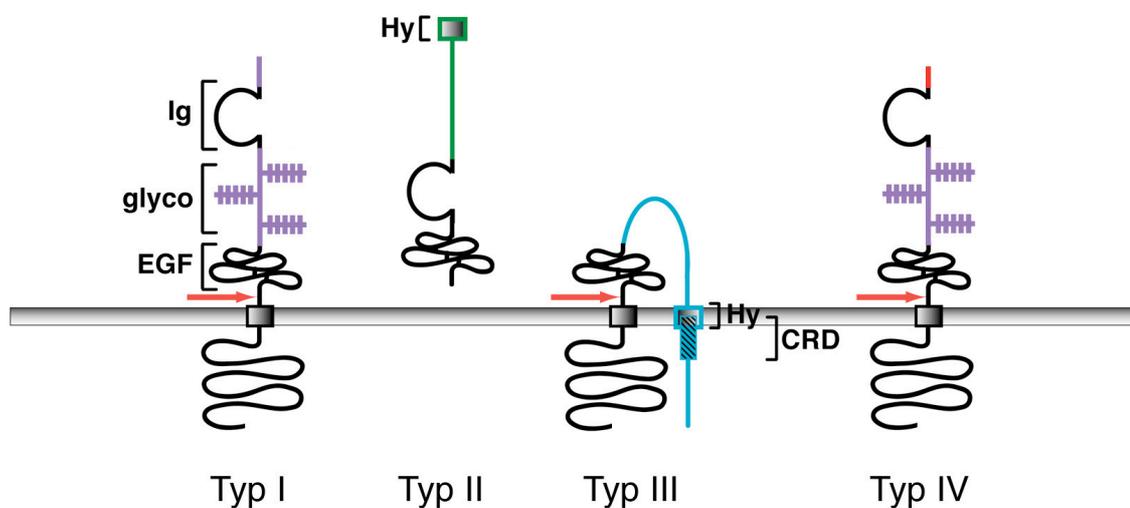


Abb. 1. Neuregulin-1 (Nrg1) ist ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Protein, das in verschiedenen Isoformen produziert wird (hier schematisch dargestellt). Einige dieser Isoformen enthalten eine Schnittstelle für die Protease BACE1 (roter Pfeil; siehe auch Text unten). Die Spaltung durch BACE1 resultiert in einer Freisetzung der Typ I und Typ IV Isoformen von der Zelloberfläche, zum Beispiel in den synaptischen Spalt. Die Typ III Isoform bleibt auch nach der Spaltung durch BACE1 an der Zelloberfläche verankert, da sie eine zusätzliche N-terminale transmembran Domäne enthält (Hy), die innerhalb einer Cystein-reichen Sequenz lokalisiert ist. Nach der Spaltung kann die zyttoplasmatische Domäne von Nrg1 auch als lösliches Molekül in die Zelle freigesetzt werden. Abkürzungen: Ig, Immunglobulin-ähnliche Domäne; glyco, glykosilierte Sequenzen; EGF, Epidermal-Growth-Factor-ähnliche Domäne; Hy, hydrophob; CRD, Cystein-reiche-Domäne.

Allen Isoformen gemeinsam ist die EGF-ähnliche Domäne, die Bindung und Aktivierung der ErbB-Rezeptoren vermittelt. Die Isoformen werden entweder sezerniert (Typ II) oder sie sind membran-assoziiert (Typen I, III, IV). Membran-assoziierte Isoformen können durch Proteolyse freigesetzt werden (Abbildung 1). Die verschiedenen Isoformen zeigen unterschiedliche Expressionsmuster und übernehmen verschiedene Funktionen in der Entwicklung. Die strukturelle Vielfalt der Nrg1 Isoformen sowie die Tatsache, dass Nrg1 von vielen Zelltypen produziert wird und auf viele Zelltypen wirkt, führte dazu, dass der Faktor mehrfach unabhängig durch verschiedene Forschergruppen entdeckt wurde [22-25].

Wie andere Rezeptortyrosinkinasen sind ErbB-Rezeptoren nicht nur in malignen Zellen aktiv, sondern sie sind auch entscheidende Regulatoren während der Entwicklung. Genetische Analysen, die ursprünglich in Mäusen, später aber auch in Zebrafischen durchgeführt wurden, waren ausschlaggebend für die Aufklärung dieser Funktionen. Während der Embryonalentwicklung ist Nrg1 der wichtigste der ErbB-Liganden. Vergleiche zwischen *ErbB2* und *Nrg1* Mausmutanten zeigten, dass die Phänotypen bemerkenswert ähnlich sind. Dies bedeutet, dass ErbB2 entscheidend für die Signalübertragung von Nrg1 ist [26, 27]. Dieser Befund war nicht vorherzusehen, da ErbB2 weder Nrg1 noch andere Liganden mit hoher Affinität bindet [28, 29]. Die Ähnlichkeit der Phänotypen spiegelt die wichtige Funktion von ErbB2 als Ko-Rezeptor wider, die auch aus biochemischen Untersuchungen ersichtlich wurde [30, 31]. Die genetischen Untersuchungen zeigten, dass während der frühen Mausentwicklung entweder ErbB2/ErbB3 oder ErbB2/ErbB4 Heteromere das Nrg1-Signal übertragen können, während ErbB2/ErbB3 im peripheren Nervensystem, und ErbB2/ErbB4 im Herzen aktiv sind. ErbB4 ist auch während der späten Entwicklung des zentralen Nervensystems aktiv, die Rolle von ErbB2 in diesem Prozess wurde aber noch nicht ausreichend untersucht. Es wäre also möglich, dass ErbB4 in diesem Kontext keinen Ko-Rezeptor nutzt.

2. Funktionen von Nrg1/ErbB-Signalen in Vorläufer Schwann'scher Zellen

Nrg1 wurde u.a. auch als mitogener Faktor für Schwann'sche Zellen charakterisiert [18, 20, 32]. Die bedeutende Rolle von Nrg1 in der Entwicklung der Schwann'schen Zellen *in vivo* wurde zum ersten Mal von Meyer und Birchmeier beschrieben [27]. Hier konnte gezeigt werden, dass die ErbB3-positiven Vorläufer der Schwann'schen Zellen, die normalerweise entlang der Axone zu finden sind, in *Nrg1*-Mutanten fehlten. Da in diesen Mutanten alle

Isoformen von Nrg1 inaktiviert waren, war es jedoch unklar, welche Isoform von Nrg1 für diesen Phänotyp verantwortlich war.

In meinen Arbeiten konnte ich zeigen, dass Typ III Nrg1 die Entwicklung der Vorläufer von Schwann'schen Zellen steuert. Dazu untersuchte ich mutante Embryonen, die nur Typ III Nrg1, jedoch weder Typ I Nrg1 noch Typ II Nrg1 erzeugen (Ig-spezifische Mutation von *Nrg1* [33]). In diesen Embryonen konnten mittels in-situ-Hybridisierung mit Sonden gegen ErbB3 sowie den niederaffinen Neurotrophin-Rezeptor p75 die Vorläufer von Schwann'schen Zellen entlang der peripheren Nerven dargestellt werden. In Null-Mutanten für Nrg1 fehlten diese Zellen, jedoch wurde dieser Phänotyp durch die Expression der Typ III Isoform in den Ig-spezifischen Nrg1 Mutanten gerettet [**Originalarbeit 1**]. Mittels eines LacZ-Reporterallels [27] konnte ich das Expressionsmuster der Typ I-Isoform von Nrg1 in Embryonen untersuchen. Dies ergab, dass Typ I Nrg1 in der Anlage des Trigemini sowie im Endokard des Herzens exprimiert wird. Durch Immunhistologie mit Antikörpern gegen die leichte Kette von Neurofilament konnte ich zeigen, dass die Entwicklung des Anteils der kranialen Ganglien, die aus der Neuralleiste entstehen, von Typ I Nrg1 abhängt. Darüber hinaus konnten Vergleiche zwischen den Null-Mutanten und den Ig-Isoform spezifischen Mutanten von *Nrg1* zusammen mit der Expressionsanalyse der Nrg1-Isoformen zeigen, dass Typ I Nrg1 unerlässlich für die frühe Entwicklung und Trabekulierung des Herzens ist [**Originalarbeit 1**].

Typ III Nrg1 wird von sensorischen und motorischen Neuronen gebildet, und als transmembranes Molekül in die axonale Membrane inseriert [34-36]. Zellkulturarbeiten belegen, dass axonale Nrg1-Signale von Schwann'schen Zellen durch ein ErbB2/ErbB3-Heteromer empfangen werden [37-41]. Da *ErbB2*-, *Nrg1*-, sowie *ErbB4*-Mutanten am embryonalen Tag 10,5 (E10,5) wegen fehlender Trabekulierung des Herzens sterben, konnte erst mit der Erzeugung von *ErbB3* sowie sogenannter „heart rescue“ *ErbB2* Mutanten gezeigt werden, dass alle Schwann'schen Zellen von Nrg1/ErbB2/ErbB3-Signalen abhängig sind [42-46]. Die Zeitspanne, in der *in vitro* kultivierte Schwann'sche Zellvorläufer Nrg1 für Proliferation sowie Überleben benötigen, endet mit der Transition zur ausgereiften, differenzierten Schwann'schen Zelle [37, 40, 47, 48]. Nach dieser Transition erzeugen die differenzierten Schwann'schen Zellen in einem autokrinen Mechanismus Überlebensfaktoren und werden von Nrg1 unabhängig. Sie können jedoch noch immer auf den Faktor reagieren [49-52].

Originalarbeit 1

Meyer, D., Yamaai, T., Garratt, A. N., Riethmacher-Sonnenberg, E., Kane, D., Theill, L., & Birchmeier, C. (1997) Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* **124**, 3575-3586.

PMID: 9342050

<http://dev.biologists.org/content/124/18/3575.long>

3. Verwendung des Cre-loxP-Systems um spätere Funktionen von Nrg1/ErbB zu eruieren

Nrg1 wird in sensorischen und motorischen Neuronen bis ins Erwachsenenalter exprimiert. Differenzierende sowie ausgereifte Schwann'sche Zellen exprimieren *ErbB2* und *ErbB3*, wobei die *ErbB2* Expression während der Entwicklung allerdings höher ist [37, 53, 54]. Um die Funktionen von ErbB/Nrg1-Signalen in der Maus in differenzierenden und ausgereiften Schwann'schen Zellen zu untersuchen, musste die embryonale oder postnatale Letalität, die mit der Inaktivierung von *Nrg1/ErbB2* und *ErbB3* Genen einhergeht, vermieden werden. Um dies zu ermöglichen, etablierte ich einen Mausstamm, in dem das *ErbB2*-Gen mittels Cre-Rekombinase konditionell inaktiviert werden konnte.

Das Verfahren der konditionellen Geninaktivierung in der Maus wurde im Labor von Klaus Rajewsky entwickelt und erlaubt das gewebespezifische und/oder zeitlich kontrollierte Ausschalten von Genen. In das zu mutierende Gen werden *loxP* Erkennungssequenzen inseriert, die die zu deletierende genomische DNS flankieren. Die *loxP* Sequenzen sind palindromische DNS-Elemente von 34 Basenpaaren Länge, die von der Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 erkannt werden und für die Vermehrung von P1 notwendig sind [55]. Brian Sauer konnte Ende der 80er Jahre in Hefe-Zellen zeigen, dass von *loxP* Sequenzen flankierte DNS-Abschnitte durch Cre-Rekombinase deletiert werden [56]. Dieses „Cre-loxP-System“ wurde dann von Klaus Rajewsky angewendet, um konditionelle Genmutationen in der Maus zu erzielen [57]. Diese Mäuse tragen ein gewebespezifisches *cre*-Transgen sowie ein „gefloxtes“ Allel des zu mutierenden Gens. Ausschließlich in dem Gewebe, in dem die Cre-Rekombinase exprimiert wird, wird dann das gefloxtete Gen inaktiviert.

ErbB3- sowie „heart rescue“ *ErbB2*- und *Nrg1* ^{β/β} - mutante Mäuse können nicht atmen und sterben am ersten Tag nach der Geburt aufgrund einer Degeneration des peripheren Nervensystems. In diesen Mäusen fehlen alle Schwann'schen Zellen. Untersuchungen mit chimären Mäusen, die *ErbB3*-null sowie *ErbB3*-Wildtyp Zellen enthielten, zeigten, dass das Zugrundegehen der peripheren Nerven durch das Fehlen der Schwann'schen Zellen hervorgerufen wird [42]. Da ich nach der Funktion der ErbB/Nrg1-abhängigen Signale in der späteren Entwicklung und Aufrechterhaltung der Schwann'schen Zellen suchte, musste ich eine Strategie wählen, in der die frühe Nrg1-abhängige Phase der Proliferation bzw.

Migration von Schwann'schen Zellen nicht gestört wurde. Ich wählte das *Krox20*-Gen als Treiber für die Expression der Cre-Rekombinase: *Krox20* wird, abgesehen von einer früheren Expression in den Spinalwurzeln, in peripheren Nerven erst spät in der Entwicklung von Schwann'schen Zellen exprimiert [58].

3.1 Nrg1/ErbB-Signale steuern die Myelinisierung der peripheren Nerven

Krox20-cre Mäuse wurden durch das Labor vom Patrick Charnay (École Normale Supérieure, Paris) zur Verfügung gestellt [59]. Zunächst konnte ich zeigen, dass die Expression von *Krox20-cre in vivo* spezifisch für die myelinisierenden Schwann'schen Zellen war [Originalarbeit 2]. *Krox20-cre/+; ErbB2^{lox}/-* konditionelle Mutanten überlebten und enthielten Schwann'sche Zellen in ihren peripheren Nerven, was bedeutete, dass die frühe Phase der ErbB/Nrg1-abhängigen Entwicklung von Schwann'schen Zellen ungestört ablief. Mikroskopische Analysen der peripheren Nerven zeigten jedoch, dass die Myelinisierung stark beeinträchtigt war. Fast alle der myelinisierten Axone mit großem Durchmesser waren hypomyelinisiert (von zu dünnen Myelinscheiden umgeben), bzw. amyelinisiert (von einer Schwann'schen Zelle umgeben, aber völlig ohne Myelinscheide). Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Myelinisierung der peripheren Nerven von Nrg1/ErbB Signalen abhängig ist. *Krox20* wird in den ventralen spinalen Wurzeln ab etwa dem embryonalen Tag 11,5 exprimiert [58], d.h. zu einem Zeitpunkt an dem die Schwann'schen Zellen noch von Nrg1/ErbB Signalen für Proliferation bzw. Migration abhängen. Konsistenterweise konnte ich in *Krox20-cre/+; ErbB2^{lox}/-* konditionellen Mutanten beobachten, dass die Schwann'schen Zellen in den spinalen Wurzeln am postnatalen Tag 15 fast vollständig fehlten [Originalarbeit 2]. Dies lieferte einen weiteren Beweis dafür, dass ErbB/Nrg1-Signale für die Expansion der Schwann'schen Zellpopulation nötig sind. Mit zunehmendem Alter konnten jedoch vermehrt Schwann'sche Zellen in den ventralen Wurzeln beobachtet werden. Allerdings waren die Axone in den ventralen Wurzeln zu diesen späten Stadien hypomyelinisiert.

Das Verhältnis zwischen dem axonalen Durchmesser und der Dicke der Myelinscheide wurde Ende des 19. Jahrhunderts bzw. Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals beschrieben [60]. Wird der Quotient aus dem Durchmesser des Axons und dem Durchmesser des Axons plus der Myelinscheide (im Englischen, „G-ratio“ genannt) in peripheren Axonen bestimmt, so ist diese konstant, unabhängig davon, ob das Axon einen kleinen oder großen

Durchmesser besitzt. Das bedeutet, dass kleine Axone eine dünne, und große Axone eine dicke Myelinscheide besitzen. Smith et al. postulierten, dass ein axonales Signal existiert, welches die Dicke der Myelinscheide bestimmt [61]. Ich kam aufgrund meiner Ergebnisse zu dem Schluss, dass ErbB2 in Schwann'schen Zellen als Ko-Rezeptor für die Weiterleitung dieses Signals fungiert [**Vorgelegte Übersichtsarbeit**]. Michailov et al. beobachteten später, dass in heterozygoten *Nrg1* Null-Mutanten, oder in heterozygoten *Typ III Nrg1* Mutanten dünnere Myelinscheiden gebildet werden. Die genetischen Analysen der Ig-spezifischen und Null-Mutanten von *Nrg1* hatten bereits gezeigt, dass Typ III Nrg1 das entscheidende axonale Signal in der frühen Entwicklung der Schwannzelllinie darstellt [**Originalarbeit 1**]. Darauf aufbauend wurden Typ III Nrg1 und Typ I Nrg1 spezifisch in Neuronen überexprimiert, und beobachtet, dass Überexpression von Typ III, aber nicht von Typ I, die Myelinscheide verdickt [62]. Zusammen zeigen diese Experimente, dass die Menge des axonalen Typ III Nrg1 die Dicke der Myelinscheide bestimmt.

Originalarbeit 2

Garratt, A. N., Voiculescu, O., Topilko, P., Charnay, P., & Birchmeier, C. (2000) A dual role of *erbB2* in myelination and in expansion of the Schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* **148**, 1035-1046.

PMID: 10704452

<http://jcb.rupress.org/content/148/5/1035.long>

Vorgelegte Übersichtsarbeit

Garratt, A. N., Britsch, S., & Birchmeier, C. (2000) Neuregulin, one factor with many functions in the life of a Schwann cell. *Bioessays* **22**, 987-996.

PMID: 11056475

DOI: 10.1002/1521-1878(200011)22:11<987::AID-BIES5>3.0.CO;2-5

3.2 Funktion der Nrg1/ErbB-Signalkaskade in embryonalen und adulten Herzen

3.2.1 Konditionelle Inaktivierung von *ErbB2* führt zur dilatativen Kardiomyopathie

Untersuchungen von Embryonen, in denen Nrg1, ErbB2 oder ErbB4 fehlten, zeigten, dass Typ I-Nrg1/ErbB Signale für die Bildung der Trabekeln im Herz benötigt werden [**Originalarbeit 1**, 26, 27, 33, 63]. Wenn dieses Signal fehlt, sterben die Embryonen am Tag E10,5, da ihr Herz nicht effizient arbeiten kann. Typ I Nrg1 wird im Endokard gebildet, während die heteromeren ErbB2/ErbB4-Rezeptoren im Myokardium exprimiert werden. Die genauen molekularen und zellulären Folgen des fehlenden Nrg1/ErbB Signals, die zu einer gestörten Trabekulierung und embryonaler Herzinsuffizienz führen, sind noch unklar. Ein Signalweg, der während der Herzentwicklung für die Übertragung von Nrg1/ErbB-Signalen wichtig sein könnte, ist die MAP Kinase Signalkaskade, die den ErbB-Rezeptoren nachgeschaltet ist. Interessanterweise führt die gezielte Mutation des *ShcA* Gens, das für einen Aktivator des MAP Kinase-Signalwegs kodiert, zu einem Herzphänotyp, der dem der *Nrg1/ErbB2/ErbB4*-Mutanten ähnelt [64].

Nrg1 wird postnatal bis ins Erwachsenenalter im Endokard sowie in mikroendothelialen Gefäßen exprimiert [65] (A. N. Garratt, C. Birchmeier, unveröffentlicht). Die heteromeren ErbB2/ErbB4-Rezeptoren hingegen werden weiter in adulten Kardiomyozyten exprimiert, und befinden sich im T-Tubulus-System sowie in den Glanzstreifen [**Originalarbeit 3**, 66, 67]. Verschiedene Funktionen des Nrg1 in postnatalen und adulten Kardiomyozyten sind *in vitro* gezeigt worden. Dazu gehören Effekte auf Überleben, hypertrophes Wachstum sowie Proliferation [68]. Darüber hinaus kann der Faktor die Kontraktilität in isolierten papillären Muskeln modulieren [69]. Der erste Hinweis auf eine Rolle von Nrg1/ErbB-Signalen bei der adulten Herzfunktion ergab sich aus klinischen Studien zur Herceptin®/Trastuzumab-Behandlung von Patientinnen mit metastasierenden Mammakarzinomen. Hier entwickelte ein Teil der Patientinnen, die mit einer Kombinationstherapie aus Herceptin®/Trastuzumab zusammen mit cytostatischen Mitteln behandelt wurden, eine Herzinsuffizienz [15].

Da Herceptin®/Trastuzumab nur den menschlichen ErbB2-Rezeptor erkennt, ist es nicht möglich, Nebenwirkungen des Medikaments, die durch eine Blockade von ErbB2 ausgelöst werden, in Tiermodellen zu untersuchen. In Zusammenarbeit mit dem Kardiologen Cemil Özcelik (Charité, Berlin) etablierte ich deshalb Mäuse, in denen *ErbB2* im Herzen

konditionell inaktiviert wurde. Wichtig hierfür war, Mausstämme zu züchten, in denen *ErbB2* nur in einem Teil der Kardiomyozyten inaktiviert wurde, damit die embryonale Entwicklung weitestgehend normal ablaufen würde. Um dies zu ermöglichen, wurde der *Mlc2v-cre* Knock-in Mausstamm von Ken Chien, University of California San Diego, verwendet. In konditionellen *Mlc2v-cre/+; ErbB2^{fllox}/-* mutanten Mäusen war die Trabekulierung des Herzens am Tag E10,5 von Kontrollmäusen nicht zu unterscheiden [**Originalarbeit 3**]. Die konditionellen Mutanten wurden gemäß Mendelscher Verteilung geboren, jedoch starb ein Sechstel der Mäuse innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen. Mittels echokardiographischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die überlebenden Mäuse eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten, die nach dem zweiten postnatalen Monat zu beobachten war. Mittels Mikroarrayanalyse wurde am Tag P12,5 eine starke kompensatorische hypertrophe Reaktion auf den Verlust von ErbB2 beobachtet, lange bevor eine offensichtliche kontraktile Dysfunktion gemessen werden konnte. Elektrophysiologische Analysen von konditionellen *ErbB2* und *ErbB4* Mutanten deckten auf, dass keine kompensatorische Tachykardie auftrat und dass die QT_c-Zeit verlängert war, ein Indiz dafür, dass es funktionelle Störungen in Na⁺ bzw. K⁺-Kanälen gab [**Originalarbeit 3**, 66]. Da das *Mlc2v-cre*-Allel nur in einem Teil der Kardiomyozyten aktiv ist, enthielten die Herzen der *Mlc2v-cre/+; ErbB2^{fllox}/-* mutanten Mäuse eine Mischung von Kardiomyozyten mit einem heterozygoten Genotyp *ErbB2^{fllox}/-* (nicht rekombiniert) sowie dem Null-Genotyp *ErbB2^A/-* (rekombiniertes *ErbB2^{fllox}*-Allel). Nachdem ich Kardiomyozyten aus dem Herzventrikel gewonnen hatte, untersuchte ich, ob die Kardiomyozyten mit dem Genotyp *ErbB2^A/-* häufiger durch programmierten Zelltod eliminiert werden. Vergleiche mittels Southern-Blot-Analyse zwischen *Mlc2v-cre/+; ErbB2^{fllox}/+* und *Mlc2v-cre/+; ErbB2^{fllox}/-* Mäusen zeigten keine deutlichen Verluste der Kardiomyozyten mit dem Genotyp *ErbB2^A/-* [**Originalarbeit 3**]. Darüber hinaus wurde keine deutliche Erhöhung des Zelltods mittels TUNEL-Analyse in konditionellen mutanten Herzen gefunden. Dies war ein Indiz dafür, dass die Dysfunktion des *ErbB2*-mutierten adulten Herzen nicht durch programmierten Zelltod verursacht wurde. Die Untersuchungen mit herzspezifischen *ErbB2* Mutanten zeigten, dass ErbB-abhängige Signale für die Aufrechterhaltung der Pumpfunktion des Herzens bis ins Erwachsenenalter benötigt werden. Darüber hinaus konnte man aus diesen Ergebnissen zur Schlussfolgerung kommen, dass die Nebenwirkungen des Medikaments Trastuzumab/Herceptin® auf der Blockade von ErbB2 im Herzen beruhen.

Originalarbeit 3

Özcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., Hubner, N., Chien, K. R., Birchmeier, C., & 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**, 8880-8885.

PMID: 12072561

<http://www.pnas.org/content/99/13/8880.long>

3.2.2 Herzfunktion in adulten Mäusen ist von der Menge Nrg1 abhängig

ErbB2 ist an der Signalübertragung mehrerer heteromerer Rezeptoren und EGF-ähnlicher Liganden beteiligt, und es war deshalb unklar, welches Signal von ErbB2 im adulten Herzen übermittelt wird. Meine Untersuchungen von Embryonen hatten gezeigt, dass in der Entwicklung des Herzens eine bestimmte Nrg1 Isoform, Typ I, benötigt wird [Originalarbeit 1]. Typ I Nrg1 wird in zwei Varianten, Alpha und Beta, gebildet. Ein neues mutantes *Nrg1* Allel wurde erzeugt, in dem eine spezifische Mutation in die α -Variante eingeführt wurde [70]. Nachdem ich Mäuse mit dem *Nrg1* α -Allel und einem Nullallel von *Nrg1* verkreuzt hatte, beobachtete ich in älteren Tieren eine starke Dilatation der Herzen. Die Entwicklung dieses Phänotyps wurde mittels Echokardiographie näher untersucht. Die dilatative Kardiomyopathie der *Nrg1* α - mutanten Mäuse setzte früher ein und war stärker ausgeprägt als in den konditionellen *ErbB2* Mutanten (C. Özcelik, A.N. Garratt, unpublizierte Arbeiten; siehe Abbildung 2). Ein Nrg1 Signal, das durch den ErbB2 Rezeptor vermittelt wird, ist also für die Herzfunktion im erwachsenen Organismus notwendig.

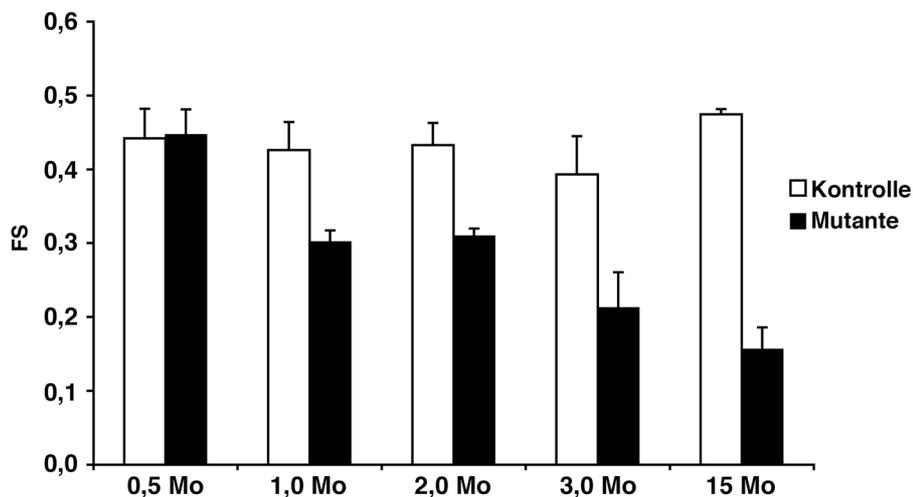


Abb. 2: Mutation von *Nrg1* führt zur dilatativen Kardiomyopathie im adulten Herzen. Untersuchungen der Herzfunktion (FS, „Fractional Shortening“) mittels echokardiographischer Analyse in Kontrollen (*Nrg1* $^{+/-}$, weiße Balken) und *Nrg1* α - mutanten Mäusen (schwarze Balken) zeigen einen Verlust bis zu 67% mit zunehmendem Alter (Mo, Alter in Monaten) in den mutanten Tieren.

Die molekularen und zellulären Mechanismen, die nach der Aktivierung von ErbB2/ErbB4-Heteromeren durch Nrg1 zur Aufrechterhaltung der Pumpfunktion im Herzen

führen, sind noch unklar. Meine Untersuchungen zeigten, dass das ErbB/Nrg1-System nicht primär das Überleben der Kardiomyozyten, jedoch die Funktion des Myokardiums beeinflusst. Vor kurzem wurde von Anderen beobachtet, dass ErbB/Nrg1-Signale die Proliferation, jedoch nicht das Überleben mononukleärer Kardiomyozyten in postnatalen Mäusen stimulieren, und so zu einer verbesserten Pumpfunktion nach einem Herzinfarkt führen [71]. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von José Luis de la Pompa, Madrid, konnte ich zeigen, dass Nrg1 während der embryonalen Entwicklung die Differenzierung von Kardiomyozyten, jedoch nicht die Proliferation, beeinflusst [72]. Untersuchungen in Zebrafischen zeigten, dass Nrg1 die Differenzierung des embryonalen Erregungs-Leitungssystems stimuliert [73]. Darüber hinaus ist die Expression von Nrg1 im embryonalen Endokard von Ephrin-B2, welches selbst durch Notch-1 kontrolliert wird, abhängig. Noch ist unklar, ob die kompensatorische Hypertrophie in konditionellen *Mlc2v-cre/+; Erbb2^{fllox}/-* mutanten Mäusen durch eine aberrante Differenzierung, durch reduzierte zelluläre Proliferation oder durch Kontraktilitätsdefekte der Kardiomyozyten verursacht wird [Originalarbeit 3].

4. BACE1-abhängige Proteolyse von Nrg1 reguliert die Myelinisierung des peripheren Nervensystems

Nrg1 wurde ursprünglich u.a. als löslicher Faktor von ~45 kDa aus Kulturüberständen von Fibroblasten bzw. Mammakarzinomzelllinien isoliert [23, 25]. Sequenz-Analysen der korrespondierenden cDNA-Klone zeigten jedoch, dass diese löslichen Nrg1 Isoformen durch Proteolyse transmembraner Vorläufermoleküle entstanden. Die Analyse der C-terminalen Peptide deckte auf, dass transmembrane Nrg1-Isoformen in der juxtamembranen Sequenz (MKVQ bzw. MASFY) gespalten werden konnten [74]. Biochemische Untersuchungen mittels Zellkultur zeigten, dass dies durch Ca^{2+} -unabhängige Zn^{2+} -Metalloproteasen geschah, deren Aktivität zum Teil durch Aktivierung von Protein Kinase C beeinflusst wurde [75-77]. Es war jedoch unklar, welche Proteasen für diese Spaltung verantwortlich waren, und ob die Spaltung eine biologische Bedeutung *in vivo* hat.

Eine Familie von Zn^{2+} -abhängigen Metalloproteasen, als deren erste Mitglieder Proteine kloniert wurden, die für die Fusion von Spermium mit Eizelle notwendig sind, stellt die A-Disintegrin-and-Metalloprotease-(ADAM)-Familie dar [78]. Mit der Klonierung von Tumour-Necrosis-Factor- α -Converting-Enzyme (TACE/ADAM17) konnte dann die Aktivität eines ADAMs mit der Spaltung und Funktion eines spezifischen Substrats (Tumour-Necrosis-Factor, TNF) in Verbindung gebracht werden [79, 80]. Analyse von Mäusen, in denen das *TACE/ADAM17*-Gen inaktiviert wurde, zeigte jedoch, dass TACE auch andere Substrate spaltet und aktiviert, darunter den ErbB1-Liganden Transforming-Growth-Factor- α ($\text{TGF}\alpha$) [81]. Darüber hinaus wurde in Fibroblasten von *ADAM17*^{-/-} Mäusen eine erniedrigte Freisetzung von Nrg1-Isoformen beobachtet, die mit reduzierter autokriner Phosphorylierung von ErbB2 einherging [82]. Obwohl Nrg1 durch ADAM17 in Zellkultur-Experimenten effizient freigesetzt werden kann, ergab die Analyse von *ADAM17*-Maus-Mutanten, die bis zur dritten postnatalen Woche überleben, keine offensichtliche Ähnlichkeit zu den Phänotypen von *Nrg1/ErbB*-Mutanten [**Vorgelegte Übersichtsarbeit**, 81, 83]. Ebenso war unklar, ob die Spaltung von Nrg1 durch andere Proteasen kompensiert wird, oder ob *in vivo* Proteolyse eine wesentliche Rolle in der Funktion von Nrg1 spielt.

Andere Substrate von ADAM-Proteasen sind u.a. der Rezeptor Notch (gespalten durch ADAM10/ α -Sekretase/Kuzbanian) und Amyloid-Precursor-Protein (APP); APP

Spaltung durch ADAM10 produziert das nicht-toxische extrazelluläre Eiweißfragment APPs α . APP wird auch von β -Sekretase (β -site-APP-Converting-Enzyme-1/BACE1) und γ -Sekretasen gespalten: dies erzeugt das β -Amyloid-Protein-Fragment, das molekularpathologische Agens der Alzheimer Erkrankung [84]. BACE1 hat also eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Alzheimer Erkrankung, und wird als vielversprechendes „Target“ für innovative Therapieansätze betrachtet. Deshalb etablierten mehrere Gruppen in der akademischen sowie pharmazeutischen Forschung verschiedene mutante *BACE1* Maus-Modelle. Deren Untersuchung zeigte, dass BACE1 für die Erzeugung von β -Amyloid im zentralen Nervensystem essentiell war. Zunächst wurden keine anderen offensichtlichen Phänotypen in *BACE1*-Mutanten beobachtet, was zur Erwartung führte, mit BACE1 ein ideales molekulares Therapie „Target“ gefunden zu haben. Biochemische Untersuchungen von BACE1 in den ersten postnatalen Wochen der Maus zeigten jedoch eine sehr hohe Expression von BACE1 in sensorischen Nervenzellen und in Motoneuronen. Dies korreliert zeitlich mit der peripheren Myelinisierung, und deutet auf eine mögliche physiologische Funktion für BACE1 [**Originalarbeit 4**]. Ich führte deshalb zuerst in-situ-Hybridisierungen von sensorischen Ganglien und Rückenmark in fünf Tage alten Mäusen aus, und stellte fest, dass BACE1 in sensorischen und Motoneuronen sowie Oligodendrozyten, jedoch nicht in Schwann'schen- und Satellitenzellen des peripheren Nervensystem exprimiert wird [**Originalarbeit 4**]. Ich untersuchte mittels Elektronenmikroskopie die Myelinisierung der peripheren Nerven von postnatalen und adulten *BACE1*^{-/-} und Kontroll-Mäusen. Meine Analysen lieferten den ersten Beweis dafür, dass BACE1 wichtige Aspekte der Entwicklung des Nervensystems kontrolliert: in *BACE1*^{-/-} Mäusen waren die Nerven hypomyelinisiert, die Myelinisierung war verzögert und aberrant sortierte Remak-Fasern waren vorhanden [**Originalarbeit 4**]. Diese Phänotypen ähnelten denen der *Nrg1*^{+/-} und Schwann'schen Zell-spezifischen *ErbB2* Mutanten [**Originalarbeit 2**, 62, 85]. Biochemische Untersuchungen der *BACE1*-Mutanten zeigten, dass ungespaltenes Typ III Nrg1 im Nervensystem akkumulierte. Darüber hinaus konnte mittels eines „SEAP“ (Secreted-Alkaline-Phosphatase)-Assays die BACE1-abhängige Spaltung und Freisetzung einer an der Zelloberfläche lokalisierten Alkalische-Phosphatase-Nrg1- β_1 -Isoform gezeigt werden [**Originalarbeit 4**]. Daraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die durch BACE1 vermittelte Spaltung von Nrg1 für die Aktivierung von Nrg1 während der Myelinisierung notwendig ist. Vor kurzem wurde die Erkennungssequenz von BACE1 in Nrg1 charakterisiert: die Spaltung findet in der Sequenz HLGIEF*ME statt (Spaltung nach dem Phenylalanin), die nur in Nrg1- β_1 und dem

verwandten Nrg3, jedoch nicht in Nrg2 vorkommt [86]. Diese Sequenz befindet sich im juxtamembranen Anteil von Typ III Nrg1 (Abbildung 1, roter Pfeil; Abbildung 3): nach der BACE1-abhängigen Spaltung erfolgt die Öffnung der Haarnadelstruktur, wobei die EGF-Domäne wegen der cysteinreichen Domäne im N-Terminus membranär lokalisiert bleibt (Abbildung 3). Da ErbB-Fusionsproteine an axonalen Membranen, die rekombinantes Typ III Nrg1 exprimieren, binden, scheint das BACE1-abhängige Spaltungsprodukt von Typ III Nrg1 noch an der Oberfläche des Axons präsentiert zu werden [85]. Es bleibt zu klären, ob ein lösliches Molekül, das nach einer zweiten Spaltung auf der N-terminalen-Seite der EGF-Domäne theoretisch entstehen könnte, in peripheren Nerven biochemisch nachzuweisen ist.

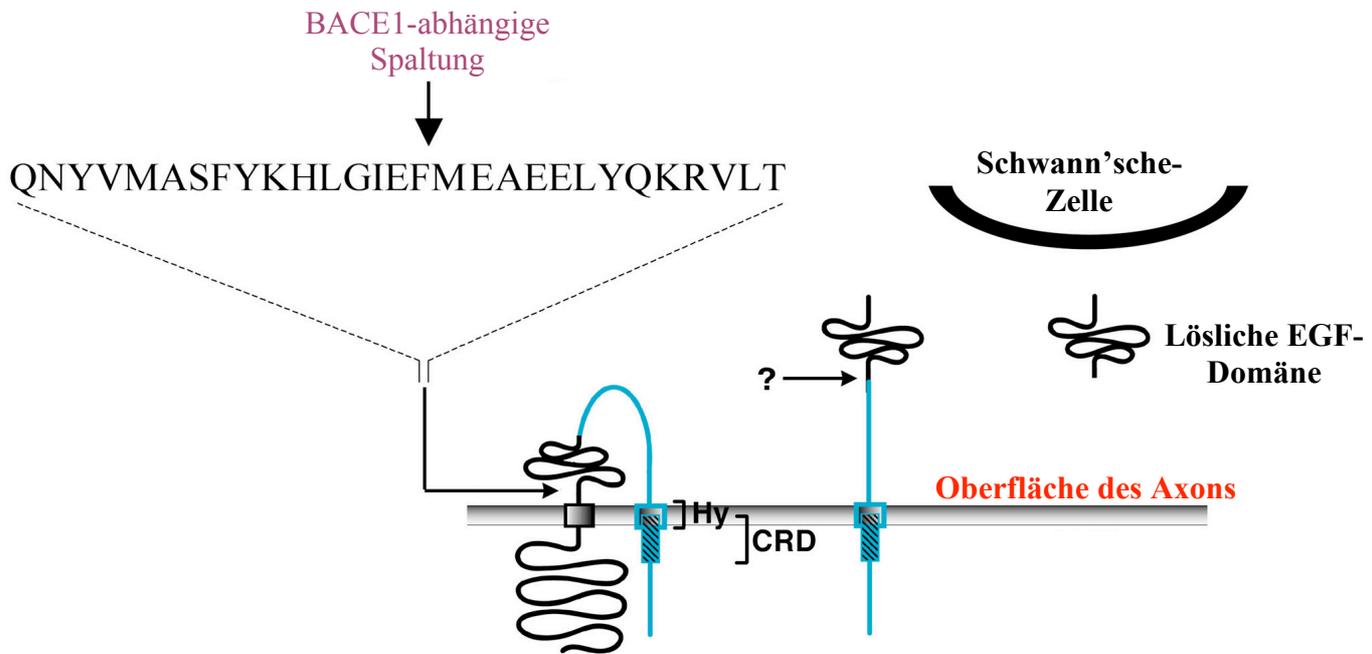


Abb. 3. Typ III Nrg1 wird auf der axonalen Membran präsentiert, um von benachbarten Schwann'schen Zellen erkannt zu werden. Die Vorläuferform des Proteins zeigt eine Haarnadelstruktur. Die Typ III Isoform bleibt auch nach der BACE1-vermittelten Spaltung der juxtamembranen Sequenz an der Zelloberfläche verankert, da sie eine zusätzliche N-terminale transmembrane Domäne enthält (Hy), die innerhalb einer cysteinreichen Sequenz lokalisiert ist. Nach einer hypothetischen zweiten Spaltung könnte die EGF-Domäne freigesetzt werden, um eine von den ErbB-Rezeptoren der Schwann'schenzelle abhängige Endozytose zu ermöglichen. Abkürzungen: EGF, Epidermal-Growth-Factor-ähnliche Domäne; Hy, hydrophob; CRD, Cystein-reiche-Domäne.

Originalarbeit 4

Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., & Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science* **314**, 664-666.

PMID: 16990514

<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/314/5799/664>

5. Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktionskette der entwickelnden und myelinisierenden Schwann'schen Zellen

Nach der Bindung von axonalem Nrg1 an den ErbB2/3-Heteromeren der Schwann'schen Zelle werden mehrere intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die zu Migration, Proliferation und Überleben der Zellen sowie zu Myelinisierung führen (siehe auch oben). Insbesondere wurde das Augenmerk der Forschung auf die Aktivität des Akt/Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bzw. des Erk/MAPK-Signalwegs gerichtet [87]. Zellkulturarbeiten mit Schwann'schen Zellen zeigten, dass der Akt/PI3K-Pfad und Erk/MAPK-Pfad antagonistisch sind: Akt/PI3K stimuliert die Zellproliferation und Myelinisierung, während die Aktivierung von MAPK die Dedifferenzierung der Schwann'schen Zellen bzw. Demyelinisierung induziert [88-90]. Ein wichtiger Aktivator des MAPK/Erk-Signalpfads, der verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen wie auch den ErbB-Rezeptoren nachgeschaltet ist, ist die zytoplasmatische Tyrosinphosphatase Shp2 (auch PTPN11). Zusammen mit Katja Grossmann und Anderen untersuchte ich die Rolle von Shp2 in der Entwicklung und Differenzierung von Schwann'schen Zellen [**Originalarbeit 5**]. Diese Arbeiten zeigten, dass Shp2 sowohl für die Nrg1-abhängige Proliferation sowie Migration der Schwann'schen Zellen, und für die Terminaldifferenzierung (Myelinisierung) benötigt wird. Durch pharmakologische Hemmung konnten wir zeigen, dass die zytoplasmatische Tyrosinkinase Src alle wichtigen zellulären und biochemischen Effekte von Shp2 steuert. Darüber hinaus verdeutlichten biochemische Analysen, dass Nrg1-Shp2-Src-Signale für die Aufrechterhaltung des Erk/MAPK-Signalpfads sowie für die Aktivierung von Focal-Adhesion-Kinase (FAK) unerlässlich sind. Im Gegensatz dazu spielen Shp2-abhängige Signale für die Nrg1-induzierte Phosphorylierung bzw. Aktivierung der Proteinkinase Akt keine Rolle. Da die Myelinisierung der peripheren Nerven in *Krox20-cre/+; Shp2^{lox/flox}* konditionellen Mutanten stark beeinträchtigt war, während zugleich die Phosphorylierung von Erk erniedrigt war und die Menge des phosphorylierten Akt Proteins unverändert blieb, konnten wir daraus schließen, dass lediglich Shp2-Src-Erk Signale, jedoch nicht die des Akt-Signalpfads, für die Bildung der Myelinscheiden benötigt werden. Weitere Experimente, in denen Akt bzw. Erk in Schwann'schen Zellen überexprimiert werden, werden durchgeführt werden, um diese Hypothese zu erhärten.

Originalarbeit 5

Grossmann, K. S., Wende, H., Paul, F. E., Cheret, C., Garratt, A. N., Zurborg, S., Feinberg, K., Besser, D., Schulz, H., Peles, E., Selbach, M., Birchmeier, W., & Birchmeier, C. (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.

PMID: 19805360

<http://www.pnas.org/content/106/39/16704.long>

6. Diskussion

Das Nrg1/ErbB Signalübertragungssystem ist vornehmlich durch seine Rolle in der Tumorgenese bekannt. Genetische Experimente von mir und anderen haben nun jedoch wichtige Funktionen von Nrg1/ErbB in der Entwicklung und Physiologie von Säugetieren aufgedeckt.

Die Vielfalt der vom *Nrg1* Gen kodierten Protein-Isoformen hat von Beginn an zahlreiche Forscher interessiert. Sie kann durch die Verwendung verschiedener Promotoren und alternatives Spleißen erklärt werden. Die Nrg1 Isoformen unterscheiden sich deutlich bezüglich ihrer Struktur, als einziges gemeinsames Merkmal teilen sie die EGF-ähnliche Domäne (Abbildung 1). Die Isoformen können sezerniert werden oder membrangebunden vorliegen. Sezernierte Isoformen binden Heparin, was vermutlich ihr freies Diffundieren *in vivo* einschränkt. Es ist außerdem möglich, dass verschiedene Isoformen gezielt an spezifische Membranen binden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die von Neuronen exprimierten Nrg1 Isoformen mit axonalen Membranen assoziieren können.

Die verschiedenen Isoformen von Nrg1 binden an die Rezeptortyrosinkinasen ErbB3 und ErbB4, während ErbB2, das als Ko-Rezeptor fungiert, nicht an der Ligandenbindung beteiligt ist. Nullmutationen in *Nrg1* oder *ErbB2* zeigen identische Phänotypen. Zugleich summieren sie die Phänotypen der jeweiligen *ErbB3* und *ErbB4* Mutanten. Da alle Nullmutationen zu embryonaler Letalität führen, war es notwendig konditionelle Mutagenese einzusetzen, um späte und adulte Funktionen von Nrg1/ErbB zu untersuchen.

Ein Vergleich des Expressionsmusters von Nrg1 Typ III mit denen der Isoformen vom Typ I und Typ II zeigt, dass nur Typ III Nrg1 in allen sensorischen und motorischen Neuronen sehr stark exprimiert wird [**Originalarbeit 1**]. Darüber hinaus konnten Taveggia und Mitarbeiter zeigen, dass Typ III Nrg1 an der axonalen Oberfläche lokalisiert ist [85]. Eine genetische Analyse mit mutanten Embryonen, in denen alle Nrg1 Isoformen deletiert waren, zeigte, dass Nrg1 für die Proliferation der Vorläufer der Schwann'schen Zellen unerlässlich ist [27]. Darauf aufbauend analysierte ich mutante Embryonen, die entweder kein Nrg1 oder nur Typ III Nrg1 exprimierten. Ich konnte zeigen, dass die Typ III Nrg1 Isoform als axonales Signal für die Entwicklung der Schwann'schen Zellen fungiert [**Originalarbeit 1**]. Die am besten charakterisierte Funktion der Schwann'schen Zellen liegt in der Myelinisierung der

peripheren Nerven, die in Mäusen erst nach der Geburt erfolgt. Wegen der embryonalen Letalität von Nullmutationen in *Nrg1*, *ErbB2*, *ErbB3* oder *ErbB4*, etablierte ich einen Mausstamm, in dem *ErbB2* konditionell mittels Cre-loxP-Technologie inaktiviert werden konnte. Durch Kreuzung dieses *ErbB2^{lox}*-Stammes mit einem, der die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Krox20*-Gens exprimiert, gelang es mir erstmals *in vivo* zu untersuchen, ob myelinisierende Schwann'sche Zellen von Nrg1/ErbB-Signalen abhängig sind. In solchen *Krox20-cre/+; ErbB2^{lox}/-* konditionellen Mutanten konnte ich eine stark ausgeprägte Hypomyelinisierung des peripheren Nervensystems beobachten [**Originalarbeit 2**]. Später etablierten Michailov et al. Mäuse, in denen Typ I oder Typ III Nrg1 neuronal überexprimiert wurden, und beobachteten eine deutliche Hypermyelinisierung der peripheren Nerven ausschließlich nach Überexpression von Typ III Nrg1 [62]. Außerdem wurde eine Hypomyelinisierung in *Typ III Nrg1+/-* heterozygoten Mäusen sowie *CNP-cre/+; ErbB3^{lox}/-* Mäusen beobachtet [62, 91]. Zusammen zeigten diese Experimente, dass axonales Typ III Nrg1 durch ErbB2/ErbB3 heteromere Rezeptoren ein Signal übermittelt, das für die Festlegung der Dicke der Myelinscheide im peripheren Nervensystem unerlässlich ist. Es scheint dafür auch nur ein eng definiertes Zeitfenster zur Verfügung zu stehen, wie man aus Arbeiten schließen kann, in denen ich *ErbB2* erst in adulten Schwann'schen Zellen inaktivierte. In solchen konditionellen Mutanten war die Dicke der Myelinscheiden nicht beeinträchtigt [92].

Die Myelinisierung ist ein komplexer morphogenetischer Vorgang, bei dem die Membran der Schwann'schen Zelle sich spiralförmig um das Axon legt. Sie geht mit einem enormen Anstieg in der Größe der Schwann'schen Zelle einher, insbesondere der Membranoberfläche. Während dieses Prozesses tritt nur ein kleiner Bereich der Schwann'schen Zelle, die adaxonale Membran, in Kontakt mit dem Axon, und nur in diesem definierten Membranbereich können axonale Signale empfangen werden. Es muss also Mechanismen geben, die dafür sorgen, dass die ErbB-Rezeptoren in der adaxonalen Membran präsentiert werden. Die gezielte Präsentation von ErbB-Rezeptoren auf spezifischen Subkompartimenten der Membran wurde weitgehend in *C.elegans* untersucht, wo eine spezifische membranäre Lokalisierung der Rezeptoren für eine erfolgreiche Signalübertragung erforderlich ist. Die Signalübertragung des EGF-Rezeptors während der Entwicklung von *C.elegans* erfolgt über einen aus drei Komponenten bestehenden Eiweißkomplex, dessen Komponenten jeweils PDZ-(PSD95-Disks-Large-ZO-1)-Domänen besitzen [93]. Dieser Komplex (LIN-7, LIN-2, LIN-10) verankert den EGF-Rezeptor im

basolateralen Membrankompartiment der epithelialen Vorläuferzellen der Vulva. Die benachbarte Ankerzelle präsentiert einen EGF-ähnlichen Liganden, und die Rezeptoraktivierung hängt essentiell davon ab, dass der Rezeptor auf dieser der Ankerzelle gegenüberliegenden Membran lokalisiert ist. Vom Säugetiergenom werden zahlreiche PDZ-Proteine kodiert. Eines davon, Erbin, interagiert mit ErbB2, aber keinem der anderen ErbB-Rezeptoren, und kolokalisiert mit ErbB2 an der basolateralen Oberfläche von epithelialen Zellen [94]. *In vitro* Untersuchungen deuten darauf hin, dass Erbin neben ErbB2 möglicherweise eine ganze Gruppe von weiteren Interaktionspartnern besitzt, zum Beispiel β_4 -Integrin, SMADs, Ionkanäle und Delta-Catenin [95-98]. Frühe Experimente betonten die Rolle von Erbin bei der Lokalisierung von ErbB2 im basolateralen Subkompartiment von epithelialen Zellen, aber neuere Studien bringen Erbin mit der Stabilisierung und Internalisierung des ErbB2-Rezeptors in Verbindung. Die erste genetische Analyse von *Erbin* deckte seine Rolle bei der Myelinisierung der peripheren Nerven auf [99]. *Erbin* $-/-$ Mäuse zeigten eine Hypomyelinisierung und fehlerhafte Segregation der afferenten Fasern mit kleinem Durchmesser, ein Phänotyp, der dem von Mäusen mit Mutationen in *Typ III Nrg1* oder konditionellen Schwann'schen Zell-spezifischen *ErbB2* Mutanten sehr ähnelt. Identische Veränderungen wurden bei einem Erbin Konstrukt beobachtet, in dem die PDZ-Domäne selektiv entfernt und die Interaktion zwischen Erbin und ErbB2 somit unterbunden wurde. Die Menge des ErbB2 Proteins, nicht aber dessen mRNA, ist in den peripheren Nerven solcher mutanten Mäuse reduziert, was darauf hinweist, dass ErbB2 instabil wird und dass die reduzierte Menge von ErbB2 die Nrg1-Signalübertragung beeinträchtigt.

Die durch Nrg1 vermittelte Aktivierung von heteromeren ErbB2/ErbB3-Rezeptoren setzt eine komplexe Reihenfolge von molekularen Wechselwirkungen in Gang, die dazu führen, dass verschiedene Adapterproteine und Enzyme an phosphorylierte Tyrosinreste der Rezeptoren rekrutiert werden. Darunter sind Grb2, Shc, Sos, PLC γ , PI3K, und Src. Ihre Bindung und/oder Phosphorylierung aktiviert kanonische Signalkaskaden, zum Beispiel PI3K/Akt, Ras/Erk1/2, PLC γ /InsP $_2$ /Ca $^{2+}$ und Focal Adhesion Kinase (FAK), die wiederum Veränderungen im Zytoskelett bewirken und die Genexpression modulieren. Fortschritte werden weiterhin in der Identifizierung von Molekülen gemacht, die die Effekte von Nrg1 in Schwann'schen Zellen vermitteln. Eine Verbindung zwischen Nrg1, PLC γ und Calcineurin/NFAT Signalübertragung in der Kontrolle der Myelinisierung wurde vor kurzem identifiziert: die Neuralleisten-spezifische Mutation von *Calcineurin* verursacht eine schwere

Störung in der Myelinisierung, ohne die früheren Phasen der Schwann'schen Zellentwicklung zu beeinträchtigen [100]. FAK liegt der Nrg1 Aktivierung in Schwann'schen Zellen nachgeschaltet, und konditionelle Mutation von *FAK* in Schwann'schen Zellen resultiert in gestörter axonaler Sortierung und Myelinisierung [101].

Ein Teil meiner Arbeiten beschäftigte sich mit der Funktion der Tyrosinphosphatase Shp2 in Schwann'schen Zellen [**Originalarbeit 5**]. Das Shp2-Protein der Säugetiere wurde von verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander zu Beginn der 1990er Jahre identifiziert und Syp, SH-PTP2, SH-PTP3, PTP1D oder PTP2C benannt. Etwa um die gleiche Zeit wurde das *Drosophila*-Homolog, *corkscrew* (*csw*) in einem genetischen Screen identifiziert. Es wurde gezeigt, dass das korrespondierende Protein eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinphosphatase war, die eine N-terminale Src-homologe-2 Domäne (SH2) enthält. Genetische Analysen haben die Bedeutung dieser Tyrosinphosphatase für die Entstehung und Progression von Krankheiten bewiesen. In Menschen sind Keimbahn- und somatische Mutationen in *PTPN11*, dem Gen, das für Shp2 kodiert, mit den Noonan und LEOPARD Syndromen assoziiert, ebenso mit einer Zahl von Tumorarten, vorwiegend Blutkrebs (sogenannte „juvenile myelomonocytic leukemia“ (JMML)). Die Etablierung von Mäusen mit analogen Mutationen hat zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen von Shp2 bei Krankheiten beigetragen [102-105]. Trotz seiner enzymatischen Aktivität als Phosphatase funktioniert Shp2 in der Signalübertragung als ein Aktivator. Die Mutation des *Drosophila*-Homologs von *Shp2*, *corkscrew*, spiegelt Phänotypen wider, die nach Mutationen in Genen von Rezeptortyrosinkinasen wie *torso* oder *sevenless* beobachtet werden. In der Maus verursachen Nullmutationen von *Shp2* frühe embryonale Letalität, die mit Defiziten in der FGF-Rezeptor Signalübertragung in Verbindung gebracht wurde. Insbesondere hat Shp2 eine große Bedeutung bei der Regulierung des Ras/Erk1/2 Signalweges [106]. Die ausgeprägten Entwicklungsdefekte, die in Modellorganismen nach solchen „loss-of-function“ Mutationen in *Shp2* hervorgerufen werden, weisen auf die wichtige und evolutionär konservierte Funktion von Shp2 in der Signalübertragung von Rezeptortyrosinkinasen und Zytokinrezeptoren hin.

Aus der Neuralleisten-spezifischen Mutation von *Shp2* in Mäusen resultierte ein bemerkenswerter Verlust von Schwann'schen Zellvorläufern in den peripheren Nerven, während die Inaktivierung von *Shp2* in unreifen Schwann'schen Zellen große Defizite in der Myelinisierung verursachte [**Originalarbeit 5**]. Diese Phänotypen waren denen, die in *Nrg1/ErbB2/3* mutanten Mäusen beobachtet wurden, sehr ähnlich. Tatsächlich waren die

durch Nrg1 vermittelten zellulären Antworten, wie Proliferation und Migration, in kultivierten Schwann'schen Zellen fast vollständig aufgehoben. Die Überlappung der dysregulierten Gene in *Krox20-cre/+; Shp2^{lox/lox}* bzw. *Krox20-cre/+; ErbB2^{lox/lox}* konditionellen Mutanten war sehr ausgeprägt, ein Indiz dafür, dass Shp2 als entscheidender nachgeschalteter Regulator von ErbB2/ErbB3 Heteromeren fungiert. Vorherige Studien mit pharmakologischen Hemmern wiesen der PI3K/Akt Signalübertragung eine entscheidende Rolle in der Schwann'schen Zellentwicklung und in der Myelinisierung zu und deuteten an, dass Erk1/2-Signale nur eine geringe Rolle spielen [88, 89, 107, 108]. Biochemische Analysen zeigten jedoch, dass die Schwann'sche Zell-spezifische Mutation von *Shp2* die konstitutive Aktivität von Erk1/2 *in vivo* und *in vitro* senkte, während die Aktivierung von PI3K/Akt unverändert blieb. Neuere Arbeiten, die sich auf die konditionelle Mutation von *Erk1/2* beziehen, zeigen, dass diese Ansicht revidiert werden muss [109]. Ähnlich der Mutation von *Shp2* verursacht die Inaktivierung von *Erk1/2* in der Neuralleiste einen Verlust von Schwann'schen Zellvorläufern in den peripheren Nerven, während die Schwann'sche Zell-spezifische Mutation von *Erk1/2* die Myelinisierung beeinträchtigt [110]. Diese Ergebnisse deuten an, dass eine Shp2-abhängige konstitutive Aktivierung von Erk1/2 für die Effekte von Nrg1 *in vivo* von zentraler Bedeutung ist. Die weitere molekulare Analyse von kultivierten *Shp2* mutanten Schwann'schen Zellen deckte eine Senkung der Src- und FAK-Aktivität nach Behandlung mit Nrg1 auf. Die pharmakologische Hemmung von Src konnte die Effekte des Verlustes von *Shp2* auf die Erk1/2- und FAK-Aktivität wiedergeben [**Originalarbeit 5**]. Auf ähnliche Weise wurde die Abhängigkeit der Signalübertragung von FGF-Rezeptoren von Shp2 für Src und die konstitutive Erk1/2 Aktivierung gezeigt [111]. Der genaue Mechanismus, durch den Shp2 Src- und konstitutive Erk1/2-Aktivität reguliert, bleibt weiterhin unklar. Die zweite Kinase, die von Nrg1/Shp2 reguliert wird, FAK, ist für die Proliferation von Schwann'schen Zellen unverzichtbar [101]. Zusammengefasst reguliert Shp2 die Aktivität von mehreren Signalmolekülen, darunter FAK, Src und Erk1/2, um Proliferation, Migration und Myelinisierung von Schwann'schen Zellen *in vivo* zu erzielen.

In Schwann'schen Zellen beeinflusst Nrg1 auch die Aktivität von Mitgliedern der Rho-GTPase Familie, Cdc42 und Rac1, um Migration und Proliferation *in vivo* zu regulieren [112-114]. Die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 wurde mit den Signalfaden der c-Jun N-terminal-Kinase (JNK) und der p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinase (p38-MAPK) in Zusammenhang gebracht [115, 116]. Dies ist interessant, da die Hemmung von JNK oder p38-MAPK die Myelinisierung *in vitro* behindert [117-119]. Somit könnte die ErbB-

Signalübertragung die Differenzierung von Schwann'schen Zellen direkt durch die Rho-GTPase-Familie regulieren.

Nrg1 wird stark im sich entwickelnden und erwachsenen Gehirn der Maus exprimiert [**Originalarbeit 1**]. Der wichtigste neuronale Rezeptor für Nrg1, ErbB4, wird in sich entwickelnden und ausgereiften GABA-ergen Neuronen exprimiert. Im Gegensatz dazu wird ErbB3 hauptsächlich in unreifen und ausgereiften Oligodendrozyten exprimiert. GABA-erge Interneurone migrieren aus der „medial ganglionic eminence“ (MGE) des ventralen Vorderhirns zur sich entwickelnden Großhirnrinde. Entlang der langen Migrationsstrecke wirken verschiedene chemoattraktive und chemorepulsive Signale auf die GABA-ergen Interneurone. Interessanterweise wird Nrg1 entlang der Migrationsstrecke dieser Neuronen exprimiert, weshalb es als mögliches Signalmolekül für deren Entwicklung galt. Um die Funktionen von Nrg1 während der Gehirnentwicklung untersuchen zu können, setzte ich ein gefloxtes Allel (*Nrg1^α*) ein, in dem die Sequenzen, die für die β-Isoform kodieren, durch Cre-Rekombinase deletiert werden konnten [70, 120]. Da dieses Allel schon eine Punktmutation in den Sequenzen der α-Isoform trägt, führt die Cre-vermittelte Rekombination zu einem Nullallel von *Nrg1*. Mäuse, die das *Nrg1^α* Allel trugen, wurden mit einem *Foxg1-cre* Stamm gekreuzt, um eine Deletion von *Nrg1* in neuroepithelialen Vorläufern im Vorderhirn zu ermöglichen. Solche *Foxg1-cre/+; Nrg1^α/-* Mäuse wurden geboren, starben aber innerhalb der ersten postnatalen Tage. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Oscar Marín untersuchte ich die Folgen der Deletion von *Nrg1* auf die Entwicklung des Gehirns mit besonderem Augenmerk auf die Entwicklung der GABA-ergen Interneurone [121]. Nrg1 wird entlang eines von sogenannten „corridor cells“-gebildeten Korridors neben dem Striatum als Typ III Isoform bzw. in der Ventrikularschicht der Großhirnrinde als Typ I/II (Ig) Isoform exprimiert [**Originalarbeit 1**, 121]. In *Foxg1-cre/+; Nrg1^α/-* konditionellen Mutanten sowie herzzeretteten *ErbB4*-Mutanten war die Migration von GABA-ergen Interneurone aus dem MGE entlang des Zellkorridors und weiter zur Großhirnrinde stark beeinträchtigt. Hingegen konnte die ektopische Expression von Nrg1-Ig-Isoformen die Migrationsrichtung von den aus der MGE kommenden GABA-ergen Neuronen in kultivierten Gehirnschnitten stark umlenken.

Nrg1 Isoformen sind nicht nur für die Migration von GABA-ergen Interneuronen von entscheidender Bedeutung, sie fungieren auch als chemoattraktive Signale für das Auswachsen von thalamokortikalen Projektionen [122]. Hierfür spielen wiederum die „corridor cells“ eine entscheidende Rolle. Diese Zellen wandern aus der „lateral ganglionic eminence“ (LGE) zum MGE aus und bilden Typ III Nrg1. Dieses fungiert wiederum als chemoattraktiver Korridor für die aus dem Thalamus kommenden neuronalen Fortsätze.

Typ I und Typ II Nrg1 teilen zusätzlich zur gemeinsamen EGF-Domäne auch eine Immunglobulin-(Ig)-ähnliche Domäne, weshalb sie auch „Nrg1 Ig-Isoformen“ genannt werden. Kramer und Mitarbeiter/innen etablierten Mäuse, in denen die Ig-Nrg1 Isoformen fehlten, und beobachteten, dass die Embryonen an E10,5 an der fehlenden Trabekulierung des Herzens und aberranter Entwicklung der kranialen Ganglien starben [33]. Meyer und Birchmeier mutierten mittels einer β -Galaktosidase-Neomycin-Kassette Exone, die für die EGF-Domäne kodieren, womit alle Isoformen inaktiviert wurden [27]. Durch Färbung mit einem Substrat der β -Galaktosidase konnte die Expression des Typ I Nrg1 dann sichtbar gemacht werden [**Originalarbeit 1**]. Durch einen Vergleich der Ko-Expression der verschiedenen Nrg1 Isoformen in Herz und im Nervensystem und deren Funktionen *in vivo* konnte ich zeigen, dass Typ I Nrg1 die Entwicklung des Herzens und der kranialen Ganglien steuert [**Originalarbeit 1**].

Typ I Nrg1 wird im Endokard exprimiert und beeinflusst die Trabekulierung der darunter liegenden Myokardialzellen, die ErbB2/ErbB4 Heteromere exprimieren. In den kranialen Ganglien werden die Typ I Nrg1 Signale jedoch über ErbB2/ErbB3 Heteromere übermittelt: Typ I Nrg1 wird in den aus den Plakoden kommenden sensorischen Neuronen exprimiert und durch Zellen erkannt, die aus der Neuralleiste stammen und die restlichen Anteile der kranialen Ganglien bilden. Noch ist unklar, ob das Fehlen dieser Neuralleistenderivate in den kranialen Ganglien der *Nrg1/ErbB2/ErbB3* Mutanten durch fehlende Migration oder Proliferation verursacht wird. Eine Funktion von Typ I Nrg1 in der Migration der Neuralleiste wurde jedoch für die Entwicklung des Sympathikus nachgewiesen: Typ I Nrg1 wird entlang des Migrationspfads der Vorläufer der sympathischen Neuronen exprimiert. In der Abwesenheit von Nrg1/ErbB Signalen aggregieren sich diese und verbleiben im dorsalen Teil des Embryos. In Folge fehlen dann der Truncus sympathicus und das Nebennierenmark [44].

Eine Expression von Typ I Nrg1 in einer Subpopulation der sensorischen Neuronen, der propriozeptiven Afferenzen, die den Muskelspindelapparat innervieren, konnte ebenfalls nachgewiesen werden [**Originalarbeit 1**]. Das Ausschalten aller Nrg1 Isoformen in sensorischen Neuronen mittels konditioneller Mutagenese führte zur aberranten Induktion des Muskelspindelapparats. Im Gegensatz dazu waren die Muskelspindeln einer *Typ III Nrg1* Mutante normal, was zeigte, dass Ig-Isoformen von Nrg1 den Muskelspindelapparat induzieren [123] (Abbildung 4). Die Induktion des Muskelspindelapparats durch Typ I Nrg1 läuft über ErbB2-enthaltende Heteromere in Muskelzellen [124, 125]. Typ I Nrg1 kann als lösliches Molekül in Zellkulturüberständen gefunden werden, und es war bis vor kurzem unklar, ob diese Isoform die Transmembrandomäne für ihre Funktion benötigt. Durch die Etablierung einer neuen Mutation in der Transmembrandomäne von Nrg1 konnte nachgewiesen werden, dass Typ I *in vivo* als membrangebundenes Molekül präsentiert werden muss [126].

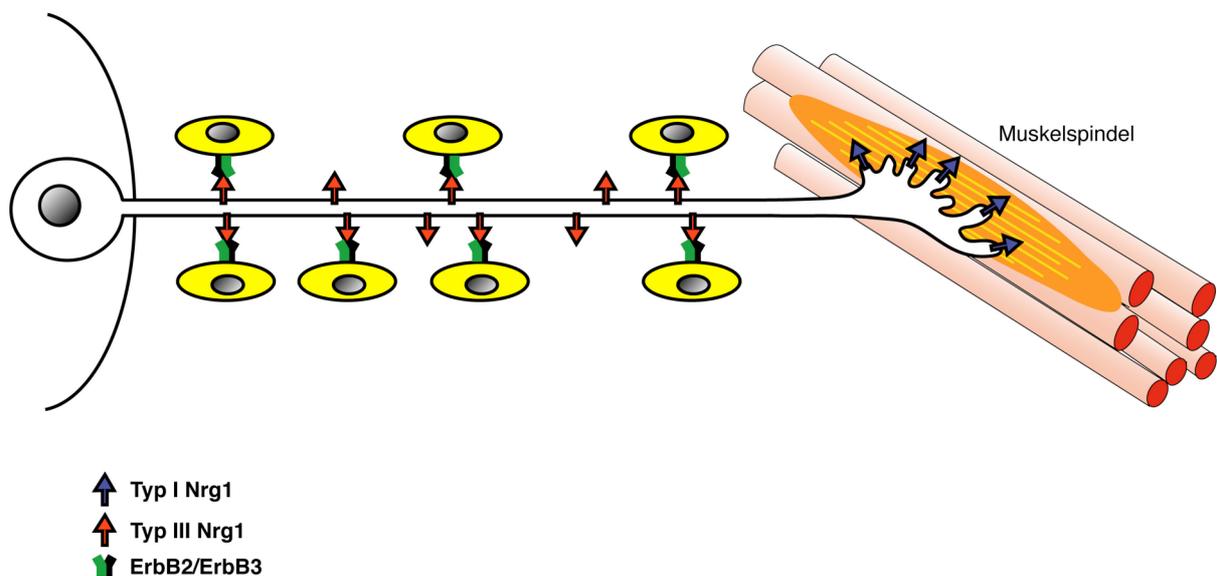


Abb. 4. Verschiedene Nrg1 Isoformen übernehmen unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung des peripheren Nervensystems. Typ III Nrg1 (roter Pfeil) findet sich an axonalen Membranen und steuert die Entwicklung und Differenzierung der benachbarten Schwann'schen Zellen (gelb). Typ I Nrg1 (blauer Pfeil) ist am Terminus von sensorischen Ia Afferenzen für die Entwicklung des Muskelspindelapparats unerlässlich.

Die Expression von Typ I Nrg1 im Endokardium ist bis ins Erwachsenenalter zu beobachten (A. N. Garratt und C. Birchmeier, unveröffentlicht), während ErbB2 und ErbB4 Heteromere in den Membranen der T-Tubuli von Kardiomyozyten exprimiert werden. Die Nebenwirkungen (Kardiomyopathie), die nach einer Behandlung mit dem monoklonalen anti-ErbB2 Antikörper Herceptin®/Trastuzumab eintreten können, waren leider in Tierversuchen nicht vorhersehbar, da das Medikament nur den menschlichen ErbB2 Rezeptor erkennt. Durch die Etablierung von *Mlc2v-cre/+; ErbB2^{fllox}/-* konditionellen Mutanten gelang es mir, ein Mausmodell zu generieren, mit dem ich die Funktion von Nrg1/ErbB Signalen im adulten Herzen untersuchen konnte [**Originalarbeit 3**]. Diese Mäuse entwickeln nach dem ersten postnatalen Monat eine starke dilatative Kardiomyopathie, die sehr dem Phänotyp von konditionellen *ErbB4* Mutanten ähnelt, die einige Zeit später von der Arbeitsgruppe um Cecilia Hertig etabliert wurden [66]. Dies zeigt, dass ErbB2/ErbB4 Heteromere an der Signalübertragung in adulten Kardiomyozyten beteiligt sind.

Das C-terminale Ende der EGF-Domäne von Nrg1 kommt entweder als α - oder β -Variante vor; die α -Isoformen haben eine niedrigere Affinität für ErbB3 oder ErbB4 als die β -Isoformen [127]. Eine homozygote Mutation der Nrg1 β -Isoformen (*Nrg1 ^{β/β}*) resultierte in später embryonaler Letalität (E18,5) mit einem Verlust von Schwann'schen Zellen und Degeneration des peripheren Nervensystems. Sie war identisch mit dem Phänotyp der *ErbB3* Mutanten [42, 128] und kongruent mit der starken Expression der β -Isoformen im Nervensystem. Im Gegensatz dazu starben *Nrg1 ^{β} /-* Mutanten (nur eine allelische Kopie der α -Isoformen) am E10,5 an fehlender Trabekulierung des Herzens [128], was zeigt, dass in der Abwesenheit der β -Isoformen die Menge der niedrigaffinen Nrg1 α -Isoformen für die Trabekulierung limitierend ist. Mäuse, die eine homozygote Mutation in den Nrg1 α -Isoformen tragen (*Nrg1 ^{α/α}*), überleben ohne offensichtlichen Phänotyp bis ins Erwachsenenalter, während *Nrg1 ^{α} /-* Mutanten eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln (Abbildung 2). Da *Nrg1 ^{α/α}* Tiere keine offensichtliche Herzinsuffizienz zeigen, bedeutet dies, dass in erwachsenen Tieren die α - und β -Isoformen von Nrg1 benötigt werden, um die Pumpfunktion des Herzens aufrecht zu erhalten.

In vielen Geweben, wie zum Beispiel im Nervensystem und im Herzen, werden beide, Nrg1 α - und Nrg1 β -Isoformen, exprimiert. Ein Organ, in dem nur die Nrg1 α -Isoformen

exprimiert werden, ist die Brustdrüse. Die Entwicklung der lobuloalveolären Brustdrüsen von *Nrg1* ^{α/α} Mäusen wurde während der Trächtigkeit und Stillzeit stark beeinträchtigt [70]. *Nrg1* α -Isoformen werden für die Proliferation des Brustdrüsenepithels und die Induktion der Expression von β -Casein benötigt. Dennoch können *Nrg1* ^{α/α} Mäuse ihre Nachkommen ausreichend ernähren.

Als *Nrg1* erstmals identifiziert und kloniert wurde, war es offensichtlich, dass der Faktor von Zellmembranen freigesetzt werden konnte [23, 25]. Die ersten Isoformen, die isoliert wurden, waren Typ I bzw. Typ II [23-25]. Proteolytische Schnittstellen wurden in der Nähe der Transmembrandomäne auf der C-terminalen Seite der EGF-Domäne der Typ I Isoformen beschrieben. In einer isolierten cDNS-Sequenz von Typ III *Nrg1* [35] (später *Nrg1* Typ III- β_3 -Isoform benannt) war jedoch diese Transmembrandomäne nicht enthalten; stattdessen enthielt diese Isoform eine andere hydrophobische Aminosäuresequenz auf der N-terminalen Seite der EGF-Domäne. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass Typ III *Nrg1* an Zellmembranen lokalisiert ist und ins Medium freigesetzt werden kann [129]. Als ich die verschiedenen biochemischen und genetischen Untersuchungen bezüglich des *Nrg1*/ErbB Signalübertragungssystems im Jahr 2000 zusammenfasste, war die Topologie der Typ III *Nrg1* Isoform noch unklar. Zu dieser Zeit zeichnete ich ihre N-terminale hydrophobische Domäne als nicht membranständig [**Vorgelegte Übersichtsarbeit**]. Erst mit den biochemischen Arbeiten von Falls et al. wurde klar, dass die am häufigsten vorkommende Form von Typ III (Typ III *Nrg1*- β_1) zwei Transmembrandomänen enthält (die N-terminale Typ III-spezifische Domäne und die Domäne an der C-terminalen Seite der EGF-Domäne) und als Haarnadelstruktur in Membranen verankert wird [19, 130] (siehe Abbildungen 1, 3).

Als beschrieben wurde, dass manche Mitglieder der ADAM-Protease-Familie *Nrg1* von Zellmembranen freisetzen konnten, gab es keine klaren Hinweise aus genetischen Untersuchungen darauf, dass diese Spaltung von *Nrg1* eine wichtige Funktion *in vivo* hätte. Erst durch eine Reihe von Befunden war es möglich, für *Nrg1* eine klare Verbindung zwischen Proteolyse und Aktivität herzustellen. Erstens wird die Protease β -Sekretase (BACE1) zur Zeit der Myelinisierung sehr stark exprimiert. Zweitens kann Typ III *Nrg1* von BACE1 *in vitro* proteolytisch gespalten werden. Drittens gibt es eine deutliche Hypomyelinisierung in *BACE1*^{-/-} Mäusen [**Originalarbeit 4**]. Trotz der Rolle von BACE1 in der Spaltung und Aktivierung von Typ III *Nrg1* ist diese Funktion erst während der

Myelinisierung des peripheren Nervensystems zu beobachten: die frühen essentiellen Funktionen von Typ III Nrg1 in Migration, Proliferation und Überleben der Schwann'schen Zellen bleiben in *BACE1* Mutanten offenbar unbeeinträchtigt. Dies könnte bedeuten, dass entweder andere Proteasen für die Aktivierung von Nrg1 während der Embryogenese verantwortlich sind, dass ungespaltenes Nrg1 ebenfalls Schwann'sche Zellvorläufer aktivieren kann oder dass eine geringere Nrg1 Aktivität für die frühen Phasen der Schwann'schen Zellentwicklung ausreicht.

Hu et al. haben beschrieben, dass BACE1 nicht nur die Myelinisierung des peripheren sondern auch des zentralen Nervensystems beeinflusst [107] und brachten dies in Verbindung mit Nrg1 Funktionen in Oligodendrozyten. Viele vorherige Studien mit kultivierten Oligodendrozyten hatten dem Nrg1 Signalübertragungssystem wichtige Funktionen in der Entwicklung und Myelinisierung von Oligodendrozyten zugeteilt. Gleichzeitige konditionelle Mutagenese beider Nrg1 Rezeptoren, ErbB3 und ErbB4, in Oligodendrozyten hat jedoch keinen Effekt auf die Myelinisierung im zentralen Nervensystem [91]. Außerdem hat meine eigene Analyse der Myelinisierung im Nervus opticus von *BACE1*^{-/-} Mutanten keine Veränderungen aufgedeckt (unveröffentlichte Daten). Dennoch können Oligodendrozyten *in vivo* auf Nrg1 reagieren, da die Überexpression von Typ III sowie Typ I Nrg1 zu Hypermyelinisierung führt [91].

BACE1 gilt als Hauptziel für die Behandlung der Alzheimer Erkrankung, da es das toxische Eiweißfragment β -Amyloid freisetzt. BACE1 hat aber eine sehr wichtige physiologische Funktion: es spaltet und aktiviert Nrg1 im Nervensystem. Dies bedeutet auch, dass Nebenwirkungen erwartet werden, wenn BACE1 gehemmt wird. So wird zum Beispiel eine starke Beeinträchtigung während der Remyelinisierung der peripheren Nerven nach Verletzung erwartet, wenn BACE1 gehemmt würde [86]. Von Bedeutung ist, dass Nrg1 ein viel besseres BACE1-Substrat als die Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) darstellt [**Originalarbeit 4**]. Es wäre also möglich, dass Nrg1 oder das Geschwistermolekül Nrg3, die beide die gleiche BACE1 Schnittstelle HLGIEF*ME enthalten, die Aktivität von BACE1 im Hinblick auf das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) reduzieren könnten. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass Nrg1 bzw. Nrg3 als natürliche kompetitive BACE1-Substrate sogar den Umsatz von APP und somit den Verlauf der Alzheimer Erkrankung positiv beeinflussen könnten.

7. Zusammenfassung

Das Gen *Neuregulin-1* (*Nrg1*), eines der größten Gene im Genom von Säugetieren, kodiert für eine Vielfalt verschiedener Isoformen, die entweder sezerniert oder als Transmembranmoleküle synthetisiert werden. Alle *Nrg1*-Isoformen besitzen eine EGF-Domäne, mit der sie an die Rezeptortyrosinkinasen ErbB3 bzw. ErbB4 binden. Diese bilden mit dem Korezeptor ErbB2 heteromere Rezeptoren aus, also ErbB3/ErbB2 bzw. ErbB4/ErbB2. Die Rezeptor-Heteromere werden durch *Nrg1*-Bindung aktiviert und setzen verschiedene intrazelluläre Signalwege in Gang, die so unterschiedliche zelluläre Antworten wie Proliferation, Migration, Überleben, und Differenzierung hervorrufen [**Vorgelegte Übersichtsarbeit**, 68].

In den vorgelegten Arbeiten wurden die Verfahren der klassischen und konditionellen Mutagenese eingesetzt, um die Funktionen des *Nrg1*/ErbB Signalübertragungssystems während der embryonalen Entwicklung bzw. in postnatalen Stadien der Maus zu untersuchen. Während der Embryogenese werden die *Nrg1*-Isoformen Typ I und Typ III u.a. im Endokard bzw. in sensorischen und Motoneuronen exprimiert [27]. Durch einen Vergleich von Mäusen, bei denen gezielt spezifische Isoformen von *Nrg1* mutiert wurden, konnte ich zeigen, dass Typ I *Nrg1* die Entwicklung des Herzens und der aus der Neuralleiste gebildeten neuronalen Anteile der kranialen Ganglien steuert, während Typ III *Nrg1* für die Entwicklung der Vorläufer der Schwann'schen Zellen unerlässlich ist [**Originalarbeit 1**]. Da die Nullmutation von *Nrg1* bzw. *ErbB2/ErbB3/ErbB4* zur embryonalen Letalität führt, entwickelte ich einen Mausstamm, in dem *ErbB2* konditionell inaktiviert werden konnte, um die Funktionen von *Nrg1*/ErbB-Signalen in der postnatalen Maus untersuchen zu können. Initial wurde mittels eines *Krox20-cre*-Treibers die Rolle des Signalsystems in ausdifferenzierenden myelinisierenden Schwann'schen-Zellen untersucht [**Originalarbeit 2**]. Diese Untersuchungen zeigten zum ersten Mal, dass *Nrg1*-ErbB-Signale eine trophische Wirkung auf die Schwann'sche Zelle ausüben, und dadurch die Dicke der Myelinscheide im peripheren Nervensystem kontrollieren.

Typ I und Typ III *Nrg1*-Isoformen werden als transmembran Moleküle synthetisiert und später durch Proteolyse in die extrazelluläre Matrix freigesetzt bzw. auf der axonalen Membran präsentiert. Michael Willem und Christian Haass (LMU, München) konnten *in vitro* zeigen, dass Typ III *Nrg1* durch die Protease β -Sekretase (BACE1) gespalten wird. Die

Inhibition dieser Sekretase ist einer der vielversprechendsten Therapieansätze für die Behandlung der Alzheimer Erkrankung, die mit Ablagerungen des Amyloid-Beta-Peptids, einem der Spaltprodukte von BACE1, assoziiert ist. Die physiologische Funktion der β -Sekretase BACE1 war bis vor kurzem ungeklärt, auch eine Nullmutation in der Maus zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp. Aufgrund dieser Erkenntnisse galt BACE1 als Hauptziel der Wirkstoffentwicklung für Therapeutika der Alzheimer Erkrankung. Durch Vergleich der Phänotypen im Nervensystem von konditionellen *ErbB2*-Mutanten mit Mäusen, in denen BACE1 fehlte, konnte ich die essentielle Funktion von BACE1 in der Nrg1-abhängigen Myelinisierung der peripheren Nerven aufdecken [**Originalarbeit 4**]. Diese Arbeit lieferte den ersten Beweis dafür, dass die Proteolyse von Nrg1 für die Aktivität des Moleküls *in vivo* von zentraler Bedeutung ist. Somit müssen in Zukunft mögliche Nebenwirkungen einer auf BACE1-Hemmung basierenden Therapie aufgrund der nachgewiesenen physiologischen Funktion dieser Protease bei der Myelinisierung in Betracht gezogen werden. Nrg1/ErbB Signale aktivieren eine Reihe von Signalpfaden in der Schwann'schen Zelle die deren Entwicklung und Differenzierung steuern. In Zusammenarbeit mit Katja Grossmann, Profs. Carmen und Walter Birchmeier und weiteren Wissenschaftlern wurden Src und MAPKinase als Nrg1 nachgeschaltete Signalpfade identifiziert, die für die frühe Entwicklung und spätere Ausdifferenzierung der Schwann'schen Zelle essentiell sind [**Originalarbeit 5**].

Nrg1-ErbB2/ErbB4-Signale sind unabdingbar für die embryonale Entwicklung des Herzens [26, 27, 63], und deren Inaktivierung in der Maus führt zur Letalität an E10,5. Untersuchungen an Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom, die mit einer antikörperbasierten Therapie (Herceptin®/Trastuzumab) gegen ErbB2 behandelt wurden, ergaben, dass ein Teil der Frauen an einer Herzinsuffizienz erkrankt war [15]. In Zusammenarbeit mit dem Kardiologen Cemil Özcelik setzte ich einen konditionellen ErbB2-Stamm ein, um die Rolle von Nrg1/ErbB-Signalen im postnatalen Herzen zu untersuchen. Die Versuchsreihe ergab, dass ErbB2 für die Aufrechterhaltung der Pumpfunktion des Herzens benötigt wird [**Originalarbeit 3**], und konnte somit erklären, wie eine Behandlung mit Herceptin®/Trastuzumab zu einer Dysfunktion des Herzens führen kann.

Die Etablierung genetisch veränderter Mäuse, in denen Nrg1 bzw. dessen Rezeptoren ErbB3/ErbB2 und ErbB4/ErbB2 mittels klassischer und konditioneller Mutagenese inaktiviert wurden, hat es ermöglicht, die Rolle der Nrg1/ErbB-Signalkaskade in der Entwicklung und Funktion des Herzens und sowie des peripheren Nervensystems von Säugetieren aufzuklären.

In den letzten Jahren hat sich zunehmendes medizinisches Interesse auf die Funktion von Nrg1/ErbB-Signalen im zentralen Nervensystem fokussiert, da Mutationen in *Nrg1*, *Nrg3* und *ErbB4* mit Schizophrenie assoziiert wurden [131-133]. Vor kurzem konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass Nrg1/ErbB4-Signale den Aufbau und die Funktion von inhibitorischen GABA-ergen Schaltkreisen im Gehirn beeinflussen [134]. Die Aufklärung der Rolle von Nrg1/ErbB-Signalen im embryonalen und adulten Gehirn und bei der Ätiologie von Erkrankungen des Nervensystems stellt damit ein sehr spannendes Thema für zukünftige Forschung dar.

8. Eigene Arbeiten, die Bestandteil dieser Schrift sind

[**Originalarbeit 1**] Meyer, D., Yamaai, T., Garratt, A., Riethmacher-Sonnenberg, E., Kane, D., Theill, L., & Birchmeier, C. (1997) *Development* **124**, 3575-3586.

[**Originalarbeit 2**] Garratt, A. N., Voiculescu, O., Topilko, P., Charnay, P., & Birchmeier, C. (2000) *J Cell Biol* **148**, 1035-1046.

[**Originalarbeit 3**] Özcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., Hubner, N., Chien, K. R., Birchmeier, C., & Garratt, A. N. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8880-8885.

[**Originalarbeit 4**] Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., & Haass, C. (2006) *Science* **314**, 664-666.

[**Originalarbeit 5**] Grossmann, K. S., Wende, H., Paul, F. E., Cheret, C., Garratt, A. N., Zurborg, S., Feinberg, K., Besser, D., Schulz, H., Peles, E., Selbach, M., Birchmeier, W., & Birchmeier, C. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16704-16709.

[**Vorgelegte Übersichtsarbeit**] Garratt, A. N., Britsch, S., & Birchmeier, C. (2000) *Bioessays* **22**, 987-996.

9. Literatur

7. Cohen, S. (1983) *Cancer* **51**, 1787-1791.
8. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., & Waterfield, M. D. (1984) *Nature* **307**, 521-527.
9. Vennstrom, B. & Bishop, J. M. (1982) *Cell* **28**, 135-143.
10. Bargmann, C. I., Hung, M. C., & Weinberg, R. A. (1986) *Nature* **319**, 226-230.
11. Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C., & Aaronson, S. A. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 9193-9197.
12. Plowman, G. D., Whitney, G. S., Neubauer, M. G., Green, J. M., McDonald, V. L., Todaro, G. J., & Shoyab, M. (1990) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4905-4909.
13. Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., & Yokoyama, S. (2003) *Mol Cell* **12**, 541-552.
14. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-137.
15. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001) *N Engl J Med* **344**, 783-792.
16. Jones, R. B., Gordus, A., Krall, J. A., & MacBeath, G. (2006) *Nature* **439**, 168-174.
17. Pawson, T. (2004) *Cell* **116**, 191-203.
18. Raff, M. C., Abney, E., Brookes, J. P., & Hornby-Smith, A. (1978) *Cell* **15**, 813-822.
19. Falls, D. L. (2003) *Exp Cell Res* **284**, 14-30.
20. Lemke, G. (1996) *Mol Cell Neurosci* **7**, 247-262.
21. Buonanno, A. & Fischbach, G. D. (2001) *Curr Opin Neurobiol* **11**, 287-296.
22. Falls, D. L., Rosen, K. M., Corfas, G., Lane, W. S., & Fischbach, G. D. (1993) *Cell* **72**, 801-815.
23. Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D., *et al.* (1992) *Science* **256**, 1205-1210.
24. Marchionni, M. A., Goodearl, A. D., Chen, M. S., Bermingham, M. O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K., *et al.* (1993) *Nature* **362**, 312-318.
25. Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S. V., Bacus, S. S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S. M., Levy, R. B., *et al.* (1992) *Cell* **69**, 559-572.
26. Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C., & Hauser, C. (1995) *Nature* **378**, 394-398.
27. Meyer, D. & Birchmeier, C. (1995) *Nature* **378**, 386-390.
28. Citri, A., Skaria, K. B., & Yarden, Y. (2003) *Exp Cell Res* **284**, 54-65.
29. Peles, E., Ben, L. R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D., & Yarden, Y. (1993) *Embo J* **12**, 961-971.
30. Carraway, K. r. & Cantley, L. C. (1994) *Cell* **78**, 5-8.
31. Plowman, G. D., Green, J. M., Culouscou, J. M., Carlton, G. W., Rothwell, V. M., & Buckley, S. (1993) *Nature* **366**, 473-475.
32. Lemke, G. E. & Brookes, J. P. (1984) *J Neurosci* **4**, 75-83.
33. Kramer, R., Bucay, N., Kane, D. J., Martin, L. E., Tarpley, J. E., & Theill, L. E. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 4833-4838.
34. Bermingham-McDonogh, O., Xu, Y. T., Marchionni, M. A., & Scherer, S. S. (1997) *Mol Cell Neurosci* **10**, 184-195.

35. Ho, W. H., Armanini, M. P., Nuijens, A., Phillips, H. S., & Osheroff, P. L. (1995) *The Journal of biological chemistry* **270**, 14523-14532.
36. Yang, X., Kuo, Y., Devay, P., Yu, C., & Role, L. (1998) *Neuron* **20**, 255-270.
37. Grinspan, J. B., Marchionni, M. A., Reeves, M., Coulaloglou, M., & Scherer, S. S. (1996) *J Neurosci* **16**, 6107-6118.
38. Levi, A. D., Bunge, R. P., Lofgren, J. A., Meima, L., Hefti, F., Nikolics, K., & Sliwkowski, M. X. (1995) *J Neurosci* **15**, 1329-1340.
39. Morrissey, T. K., Levi, A. D., Nuijens, A., Sliwkowski, M. X., & Bunge, R. P. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1431-1435.
40. Syroid, D. E., Maycox, P. R., Burrola, P. G., Liu, N., Wen, D., Lee, K. F., Lemke, G., & Kilpatrick, T. J. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9229-9234.
41. Vartanian, T., Goodearl, A., Viehover, A., & Fischbach, G. (1997) *J Cell Biol* **137**, 211-220.
42. Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R., & Birchmeier, C. (1997) *Nature* **389**, 725-730.
43. Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosin, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H., & Moore, M. W. (1997) *Development* **124**, 4999-5011.
44. Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., & Riethmacher, D. (1998) *Genes Dev* **12**, 1825-1836.
45. Morris, J. K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D., & Lee, K. F. (1999) *Neuron* **23**, 273-283.
46. Woldeyesus, M. T., Britsch, S., Riethmacher, D., Xu, L., Sonnenberg-Riethmacher, E., Abou-Rebyeh, F., Harvey, R., Caroni, P., & Birchmeier, C. (1999) *Genes Dev* **13**, 2538-2548.
47. Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (1995) *Neuron* **15**, 585-596.
48. Murphy, P., Topilko, P., Schneider, M. S., Seitanidou, T., Baron, V. E. A., & Charnay, P. (1996) *Development* **122**, 2847-2857.
49. Cheng, L., Esch, F. S., Marchionni, M. A., & Mudge, A. W. (1998) *Mol Cell Neurosci* **12**, 141-156.
50. Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (1999) *Journal Of Neuroscience*. May **19**, 3847-3859.
51. Rosenbaum, C., Karyala, S., Marchionni, M. A., Kim, H. A., Krasnoselsky, A. L., Happel, B., Isaacs, I., Brackenbury, R., & Ratner, N. (1997) *Exp Neurol* **148**, 604-615.
52. Syroid, D. E., Zorick, T. S., Arbet Engels, C., Kilpatrick, T. J., Eckhart, W., & Lemke, G. (1999) *J Neurosci* **19**, 2059-2068.
53. Chen, M. S., Bermingham-McDonogh, O., Danehy, F. T., Jr., Nolan, C., Scherer, S. S., Lucas, J., Gwynne, D., & Marchionni, M. A. (1994) *J Comp Neurol* **349**, 389-400.
54. Corfas, G., Rosen, K. M., Aratake, H., Krauss, R., & Fischbach, G. D. (1995) *Neuron* **14**, 103-115.
55. Sternberg, N., Hamilton, D., Austin, S., Yarmolinsky, M., & Hoess, R. (1981) *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **45 Pt 1**, 297-309.
56. Sauer, B. & Henderson, N. (1989) *Nucleic acids research* **17**, 147-161.
57. Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., & Rajewsky, K. (1994) *Science* **265**, 103-106.
58. Topilko, P., Schneider Maunoury, S., Levi, G., Baron Van Evercooren, A., Chennoufi, A. B., Seitanidou, T., Babinet, C., & Charnay, P. (1994) *Nature* **371**, 796-799.
59. Voiculescu, O., Charnay, P., & Schneider-Maunoury, S. (2000) *Genesis* **26**, 123-126.

60. Donaldson, H. H. & Hoke, G. W. (1905) *J Comp Neurol* **15**, 1-16.
61. Smith, K. J., Blakemore, W. F., Murray, J. A., & Patterson, R. C. (1982) *J Neurol Sci* **55**, 231-246.
62. Michailov, G. V., Sereda, M. W., Brinkmann, B. G., Fischer, T. M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M. H., & Nave, K. A. (2004) *Science* **304**, 700-703.
63. Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., & Lemke, G. (1995) *Nature* **378**, 390-394.
64. Lai, K. M. & Pawson, T. (2000) *Genes Dev* **14**, 1132-1145.
65. Zhao, Y. Y., Sawyer, D. R., Baliga, R. R., Opel, D. J., Han, X., Marchionni, M. A., & Kelly, R. A. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**, 10261-10269.
66. Garcia-Rivello, H., Taranda, J., Said, M., Cabeza-Meckert, P., Vila-Petroff, M., Scaglione, J., Ghio, S., Chen, J., Lai, C., Laguens, R. P., *et al.* (2005) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1153-H1160.
67. Ueda, H., Oikawa, A., Nakamura, A., Terasawa, F., Kawagishi, K., & Moriizumi, T. (2005) *J Histochem Cytochem* **53**, 87-91.
68. Garratt, A. N., Ozcelik, C., & Birchmeier, C. (2003) *Trends Cardiovasc Med* **13**, 80-86.
69. Lemmens, K., Fransen, P., Sys, S. U., Brutsaert, D. L., & De Keulenaer, G. W. (2004) *Circulation* **109**, 324-326.
70. Li, L., Cleary, S., Mandarano, M. A., Long, W., Birchmeier, C., & Jones, F. E. (2002) *Oncogene* **21**, 4900-4907.
71. Bersell, K., Arab, S., Haring, B., & Kuhn, B. (2009) *Cell* **138**, 257-270.
72. Grego-Bessa, J., Luna-Zurita, L., del Monte, G., Bolos, V., Melgar, P., Arandilla, A., Garratt, A. N., Zang, H., Mukoyama, Y. S., Chen, H., *et al.* (2007) *Dev Cell* **12**, 415-429.
73. Milan, D. J., Giokas, A. C., Serluca, F. C., Peterson, R. T., & MacRae, C. A. (2006) *Development* **133**, 1125-1132.
74. Lu, H. S., Hara, S., Wong, L. W., Jones, M. D., Katta, V., Trail, G., Zou, A., Brankow, D., Cole, S., Hu, S., *et al.* (1995) *The Journal of biological chemistry* **270**, 4775-4783.
75. Loeb, J. A., Susanto, E. T., & Fischbach, G. D. (1998) *Mol Cell Neurosci* **11**, 77-91.
76. Burgess, T. L., Ross, S. L., Qian, Y. X., Brankow, D., & Hu, S. (1995) *The Journal of biological chemistry* **270**, 19188-19196.
77. Han, B. & Fischbach, G. D. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**, 26407-26415.
78. Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D. G., Primakoff, P., & White, J. M. (1992) *Nature* **356**, 248-252.
79. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997) *Nature* **385**, 729-733.
80. Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., *et al.* (1997) *Nature* **385**, 733-736.
81. Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., *et al.* (1998) *Science* **282**, 1281-1284.
82. Montero, J. C., Yuste, L., Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A., & Pandiella, A. (2000) *Mol Cell Neurosci* **16**, 631-648.

83. Horiuchi, K., Zhou, H. M., Kelly, K., Manova, K., & Blobel, C. P. (2005) *Developmental biology* **283**, 459-471.
84. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., *et al.* (1999) *Science* **286**, 735-741.
85. Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R. M., Loeb, J. A., Shrager, P., *et al.* (2005) *Neuron* **47**, 681-694.
86. Hu, X., He, W., Diaconu, C., Tang, X., Kidd, G. J., Macklin, W. B., Trapp, B. D., & Yan, R. (2008) *Faseb J* **22**, 2970-2980.
87. Nave, K. A. & Salzer, J. L. (2006) *Curr Opin Neurobiol* **16**, 492-500.
88. Ogata, T., Iijima, S., Hoshikawa, S., Miura, T., Yamamoto, S., Oda, H., Nakamura, K., & Tanaka, S. (2004) *J Neurosci* **24**, 6724-6732.
89. Harrisingh, M. C., Perez-Nadales, E., Parkinson, D. B., Malcolm, D. S., Mudge, A. W., & Lloyd, A. C. (2004) *Embo J* **23**, 3061-3071.
90. Syed, N., Reddy, K., Yang, D. P., Taveggia, C., Salzer, J. L., Maurel, P., & Kim, H. A. (2010) *J Neurosci* **30**, 6122-6131.
91. 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) *Neuron* **59**, 581-595.
92. Atanasoski, S., Scherer, S. S., Sirkowski, E., Leone, D., Garratt, A. N., Birchmeier, C., & Suter, U. (2006) *J Neurosci* **26**, 2124-2131.
93. Kaech, S. M., Whitfield, C. W., & Kim, S. K. (1998) *Cell* **94**, 761-771.
94. Borg, J. P., Marchetto, S., Le Bivic, A., Ollendorff, V., Jaulin-Bastard, F., Saito, H., Fournier, E., Adelaide, J., Margolis, B., & Birnbaum, D. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 407-414.
95. Arikath, J., Israely, I., Tao, Y., Mei, L., Liu, X., & Reichardt, L. F. (2008) *J Neurosci* **28**, 7047-7056.
96. Calin-Jageman, I., Yu, K., Hall, R. A., Mei, L., & Lee, A. (2007) *J Neurosci* **27**, 1374-1385.
97. Dai, F., Chang, C., Lin, X., Dai, P., Mei, L., & Feng, X. H. (2007) *Molecular and cellular biology* **27**, 6183-6194.
98. Favre, B., Fontao, L., Koster, J., Shafaatian, R., Jaunin, F., Saurat, J. H., Sonnenberg, A., & Borradori, L. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**, 32427-32436.
99. Tao, Y., Dai, P., Liu, Y., Marchetto, S., Xiong, W. C., Borg, J. P., & Mei, L. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9477-9482.
100. Kao, S. C., Wu, H., Xie, J., Chang, C. P., Ranish, J. A., Graef, I. A., & Crabtree, G. R. (2009) *Science* **323**, 651-654.
101. Grove, M., Komiyama, N. H., Nave, K. A., Grant, S. G., Sherman, D. L., & Brophy, P. J. (2007) *J Cell Biol* **176**, 277-282.
102. Araki, T., Mohi, M. G., Ismat, F. A., Bronson, R. T., Williams, I. R., Kutok, J. L., Yang, W., Pao, L. I., Gilliland, D. G., Epstein, J. A., *et al.* (2004) *Nature medicine* **10**, 849-857.
103. Chan, G., Kalaitzidis, D., Usenko, T., Kutok, J. L., Yang, W., Mohi, M. G., & Neel, B. G. (2009) *Blood* **113**, 4414-4424.
104. Krenz, M., Gulick, J., Osinska, H. E., Colbert, M. C., Molkentin, J. D., & Robbins, J. (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18930-18935.
105. Nakamura, T., Colbert, M., Krenz, M., Molkentin, J. D., Hahn, H. S., Dorn, G. W., 2nd, & Robbins, J. (2007) *The Journal of clinical investigation* **117**, 2123-2132.
106. Mohi, M. G. & Neel, B. G. (2007) *Curr Opin Genet Dev* **17**, 23-30.

107. Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., & Yan, R. (2006) *Nat Neurosci* **9**, 1520-1525.
108. Maurel, P. & Salzer, J. L. (2000) *J Neurosci* **20**, 4635-4645.
109. Newbern, J., Zhong, J., Wickramasinghe, R. S., Li, X., Wu, Y., Samuels, I., Cherosky, N., Karlo, J. C., O'Loughlin, B., Wikenheiser, J., *et al.* (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17115-17120.
110. Newbern, J. & Birchmeier, C. (2010) *Seminars in cell & developmental biology (in press)*.
111. Yang, W., Klamann, L. D., Chen, B., Araki, T., Harada, H., Thomas, S. M., George, E. L., & Neel, B. G. (2006) *Dev Cell* **10**, 317-327.
112. Benninger, Y., Thurnherr, T., Pereira, J. A., Krause, S., Wu, X., Chrostek-Grashoff, A., Herzog, D., Nave, K. A., Franklin, R. J., Meijer, D., *et al.* (2007) *J Cell Biol* **177**, 1051-1061.
113. Nodari, A., Zambroni, D., Quattrini, A., Court, F. A., D'Urso, A., Recchia, A., Tybulewicz, V. L., Wrabetz, L., & Feltri, M. L. (2007) *J Cell Biol* **177**, 1063-1075.
114. Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Chan, J. R., & Tanoue, A. (2008) *J Cell Biol* **181**, 351-365.
115. Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., & Gutkind, J. S. (1995) *Cell* **81**, 1137-1146.
116. Minden, A., Lin, A., Claret, F. X., Abo, A., & Karin, M. (1995) *Cell* **81**, 1147-1157.
117. Fragoso, G., Robertson, J., Athlan, E., Tam, E., Almazan, G., & Mushynski, W. E. (2003) *Exp Neurol* **183**, 34-46.
118. Haines, J. D., Fragoso, G., Hossain, S., Mushynski, W. E., & Almazan, G. (2008) *J Mol Neurosci* **35**, 23-33.
119. Parkinson, D. B., Bhaskaran, A., Arthur-Farraj, P., Noon, L. A., Woodhoo, A., Lloyd, A. C., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Behrens, A., Mirsky, R., *et al.* (2008) *J Cell Biol* **181**, 625-637.
120. Yang, X., Arber, S., William, C., Li, L., Tanabe, Y., Jessell, T. M., Birchmeier, C., & Burden, S. J. (2001) *Neuron* **30**, 399-410.
121. Flames, N., Long, J. E., Garratt, A. N., Fischer, T. M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J. L., & Marin, O. (2004) *Neuron* **44**, 251-261.
122. Lopez-Bendito, G., Cautinat, A., Sanchez, J. A., Bielle, F., Flames, N., Garratt, A. N., Talmage, D. A., Role, L. W., Charnay, P., Marin, O., *et al.* (2006) *Cell* **125**, 127-142.
123. Hippenmeyer, S., Shneider, N. A., Birchmeier, C., Burden, S. J., Jessell, T. M., & Arber, S. (2002) *Neuron* **36**, 1035-1049.
124. Andrechek, E. R., Hardy, W. R., Girgis-Gabardo, A. A., Perry, R. L., Butler, R., Graham, F. L., Kahn, R. C., Rudnicki, M. A., & Muller, W. J. (2002) *Molecular and cellular biology* **22**, 4714-4722.
125. Leu, M., Bellmunt, E., Schwander, M., Farinas, I., Brenner, H. R., & Muller, U. (2003) *Development* **130**, 2291-2301.
126. Lai, D., Liu, X., Forrai, A., Wolstein, O., Michalick, J., Ahmed, I., Garratt, A. N., Birchmeier, C., Zhou, M., Hartley, L., *et al.* (2010) *Circulation research* **107**, 715-727.
127. Jones, J. T., Akita, R. W., & Sliwkowski, M. X. (1999) *FEBS letters* **447**, 227-231.
128. Li, L. (2003) Doktorarbeit, "Isoform-specific knockout of the Neuregulin-1 gene", siehe <http://kups.ub.uni-koeln.de/volltexte/2003/720/>.
129. Schroering, A. & Carey, D. J. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**, 30643-30650.
130. Wang, J. Y., Miller, S. J., & Falls, D. L. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**, 2841-2851.

131. Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T. T., *et al.* (2002) *Am J Hum Genet* **71**, 877-892.
132. Walsh, T., McClellan, J. M., McCarthy, S. E., Addington, A. M., Pierce, S. B., Cooper, G. M., Nord, A. S., Kusenda, M., Malhotra, D., Bhandari, A., *et al.* (2008) *Science* **320**, 539-543.
133. Kao, W. T., Wang, Y., Kleinman, J. E., Lipska, B. K., Hyde, T. M., Weinberger, D. R., & Law, A. J. (2010) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15619-15624.
134. Fazzari, P., Paternain, A. V., Valiente, M., Pla, R., Lujan, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marin, O., & Rico, B. (2010) *Nature* **464**, 1376-1380.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Professor Dr. Carmen Birchmeier, die es mir ermöglicht hat am Max-Delbrück-Centrum, Berlin, unter ihrer Leitung das Verfahren der gezielten Genmutationen in der Maus zu erlernen und mir die Möglichkeit geboten hat mich seit 2003 als unabhängiger Wissenschaftler einer Nachwuchsforschergruppe am MDC zu etablieren. Großer Dank gilt auch den früheren und jetzigen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Carmen Birchmeier, u.a. Andrea Leschke, Karin Gottschling, Sven Buchert, Petra Stallerow, Claudia Päseler für ihre technische Unterstützung, sowie Dr. Dirk Meyer, Tomoichiro Yamaai, Michael Strehle, Li Li, Henning Brohmann, Friedhelm Blatt, Dieter Riethmacher, Eva Riethmacher-Sonnenberg, Stefan Britsch, Cemil Özcelik, Thomas Müller, Hagen Wende, Elena Rocca, Christina Frahm, Katja Grossmann, Cyril Cheret und Dominique Bröhl. Ich möchte Henning Brohmann für seine Hilfe mit Abbildung 4 danken. Ich möchte Frau Carola Griffel für ihre stetige Hilfe und technische Unterstützung während meiner Arbeiten am MDC seit 2002 danken, sowie Frau Dr. Bettina Erdmann für Ihre Arbeiten am Elektronmikroskop und der Frau Dr. Nevena Milenkovic (Arbeitsgruppe Professor Gary Lewin, MDC) für ihre unersetzliche Mitarbeit. Professor Gary Lewin gilt mein Dank für die enge und sehr wichtige Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Neurowissenschaften seit 1998. Prof. Dr. Christian Haass und Dr. Michael Willem (Ludwig-Maximilians-Universität, München) und Prof. Dr. Paul Saftig (Universität Kiel) danke ich für die wichtige und erfolgreiche Zusammenarbeit seit 2005. Dr. Andreas Winkelmann, Dr. Sergei Maile und Prof. Dr. Anja Bräuer möchte ich für ihre Betreuung am Institut für Zell- und Neurobiologie, Zentrum für Anatomie, Charité danken.

Professor Dr. Walter Birchmeier danke ich für seine Unterstützung während meines gesamten Aufenthalts am MDC.

Ich möchte zudem meiner Frau, meinen Kindern, meinen Eltern und meiner Familie für Ihre Geduld und Liebe danken.

Erklärung

§4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift