

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Maïke Nicole Gummert

aus Alfeld

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Rolle  
des Neuregulin-ErbB4-Signalwegs  
bei der Regulation der synaptischen Plastizität  
im adulten Gehirn

Erstgutachter: Prof. Klaus-Armin Nave, PhD  
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Elisabeth Pollerberg  
Institut für Zoologie, Universität Heidelberg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2003 bis Oktober 2008 am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin (Göttingen) in der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus-Armin Nave, PhD, durchgeführt.

Danksagung:

Einen besonders großen Dank möchte ich Markus aussprechen, der mich während der gesamten Zeit ungemein unterstützt, gefördert und gefordert hat. Die zahlreichen, fruchtbaren Diskussionen und Ratschläge sowie kritische Bemerkungen führten zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Klaus möchte ich mich bedanken, dass ich in diesem breit und hochklassig aufgestellten Labor meine Promotion habe durchführen können. Intensive Gespräche führten stets zu wichtigen progressiven Ideen. Darüber hinaus möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Elisabeth Pollerberg.

Viki, Olga, Chris, Patricia S., Amit, Patricia M., Anja und Ingo möchte ich für eine entspannte Arbeitsatmosphäre, die vielen Diskussionen und Hilfestellungen bei technischen Problemen danken. Es hat großen Spaß gemacht mit euch zu arbeiten.

Carolin, Annette, Patricia S. und Ulli danke ich für die technische Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft.

Einen Dank an alle anderen Mitarbeiter der Abteilung Neurogenetik, die ein angenehmes Arbeiten ermöglicht haben.

Ich möchte Jens und Carolin einen großen Dank aussprechen, dass sie mir in besonders kritischen Zeiten zugehört und mich stets aufgebaut haben. Ohne diesen privaten Halt wäre eine derartige Arbeit nicht möglich gewesen.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
3.1	<b>Exzitatorische Neurone</b> .....	<b>7</b>
3.2	<b>Diversität der inhibitorischen Interneurone</b> .....	<b>8</b>
3.3	<b>Die Neuregulin-Familie</b> .....	<b>11</b>
3.4	<b>Myelin und die Funktion von Neuregulin 1</b> .....	<b>13</b>
3.5	<b>Die ErbB-Rezeptor-Familie</b> .....	<b>14</b>
3.6	<b>Der ErbB4-Rezeptor</b> .....	<b>16</b>
3.7	<b>Die Rolle des NRG1-ErbB4-Signalwegs bei der Regulation synaptischer Plastizität</b> .....	<b>18</b>
3.8	<b>Schizophrenie und der NRG1-ErbB4-Signalweg</b> .....	<b>21</b>
3.9	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>24</b>
4.1	<b>Herstellung einer Pyramidenzell-spezifischer ErbB4 Mausmutante</b> .....	<b>25</b>
4.2	<b>Bestimmung des Cre-Rekombinase vermittelten Rekombinationsmusters der CaMKII-Cre Mauslinie</b> .....	<b>26</b>
4.3	<b>Charakterisierung der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mausmutante</b> .....	<b>27</b>
4.3.1	Histologische Analysen zeigen keine ersichtlichen Veränderungen.....	<b>29</b>
4.3.2	Geringe Reduktion der ErbB4-Expression in der Pyramidenzell-spezifischen Nullmutante .....	<b>32</b>
4.3.3	Unveränderte Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren.....	<b>33</b>
4.3.4	Elektrophysiologische Analysen der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mausmutanten.....	<b>33</b>
4.4	<b>Postnatale ErbB4-Expressionsanalyse in Wildtyp Mäusen</b> .....	<b>35</b>
4.4.1	Zelltyp-spezifische Analyse der postnatalen ErbB4-Expression im Kortex und Hippokampus.....	<b>37</b>
4.4.2	Isoform-spezifische Expressionsanalyse von ErbB4 in der CA1-Region des Hippokampus.....	<b>42</b>
4.5	<b>Herstellung einer PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante</b> .....	<b>43</b>
4.6	<b>Bestimmung des Cre-Rekombinase vermittelten Rekombinationsmusters der mPV-Cre Mauslinie</b> .....	<b>44</b>
4.7	<b>Charakterisierung der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante</b> .....	<b>46</b>
4.7.1	Analyse der ErbB4-Expression im Kortex und Hippokampus von Zelltyp-spezifischen ErbB4 Nullmutanten.....	<b>46</b>
4.7.2	Histologische Analysen der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante .....	<b>50</b>
4.7.3	Analyse der Parvalbumin positiven Interneurone in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante .....	<b>54</b>

4.7.4	Expressionsanalysen von Neurotransmitter-Rezeptoren im Kortex und Hippokampus von PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutanten .....	55
<b>4.8</b>	<b>Expression von HA-markiertem Neuregulin 1 typ III <math>\beta</math>1a in transgenen Mäusen .....</b>	<b>57</b>
4.8.1	Herstellung der transgenen Mauslinien (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) .....	58
4.8.2	Charakterisierung der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII).....	60
4.8.2.1	Histologische Analysen der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) .....	63
4.8.2.2	PNS & ZNS Myelinisierung in der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII).....	63
4.8.3	Herstellung der transgenen Mauslinien (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM) .....	65
4.8.4	Charakterisierung der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM) .....	66
4.8.4.1	Histologische Analysen der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM).....	66
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>68</b>
5.1	ErbB4 wird überwiegend in GABAergen Interneuronen exprimiert .....	68
5.2	Die ErbB4-Splicevarianten JMb und CYT2 dominieren in PV positiven Interneuronen .....	71
5.3	Funktion des NRG1-ErbB4-Signalwegs bei der synaptischen Plastizität .....	73
5.3.1	Untersuchungen zur zelltyp-spezifischen Funktion von ErbB4.....	73
5.3.2	Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren .....	77
5.3.3	Einfluss des NRG1-ErbB4-Signalwegs auf die synaptische Transmission .....	79
5.4	Rolle des NRG1-ErbB4-Signalwegs in Schizophrenie .....	84
5.5	Expression von Epitop-markiertem NRG1 typ III in einer neuartigen transgenen Mauslinie .....	86
5.6	Kann NRG1 typ III die Myelinisierung von Dendriten auslösen? .....	87
<b>6</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>89</b>
6.1	Chemikalien und Reagenzien .....	89
6.2	Verbrauchsmaterialien .....	89
6.3	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme .....	90
6.4	Geräte .....	90
6.5	Antikörper und Enzyme .....	91
6.5.1	Primärantikörper .....	91
6.5.2	Sekundärantikörper .....	92
6.5.3	Enzyme.....	92
6.6	DNA und Protein Marker .....	92
6.7	Lösungen und Puffer .....	93
6.7.1	Puffer und Stocklösungen für Molekularbiologie .....	93
6.7.2	Lösungen für Immunhistochemie .....	94
6.7.3	Lösungen für <i>in situ</i> Hybridisierung .....	95
6.7.4	Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie .....	96
6.7.5	Puffer für Elektrophysiologie.....	97

6.8	<b>Mauslinien</b> .....	<b>97</b>
6.9	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>97</b>
6.10	<b>Plasmide</b> .....	<b>100</b>
6.11	<b>Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme</b> .....	<b>101</b>
6.12	<b>Hard- und Software</b> .....	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>102</b>
7.1	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>102</b>
7.1.1	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen .....	102
7.1.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	102
7.1.3	Ligation von DNA.....	102
7.1.4	Klonierung von PCR-Produkten.....	102
7.1.5	Klonierung von Oligonukleotiden .....	103
7.1.6	Herstellung transformationskompetenter Zellen .....	103
7.1.7	Transformation von Bakterien .....	103
7.1.8	Lagerung von Bakterienkulturen.....	103
7.1.9	Präparation von Plasmiden aus Bakterien .....	103
7.1.10	Präparation genomischer DNA aus Mausgewebe.....	104
7.1.11	Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe.....	104
7.1.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	104
7.1.13	Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	104
7.1.14	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	105
7.1.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	105
7.1.16	DNA-Sequenzierung.....	105
7.1.17	Reverse Transkriptase-PCR.....	106
7.1.18	Einzelzell Reverse Transkriptase-PCR.....	106
7.1.19	Quantitative <i>real time</i> PCR .....	107
7.2	<b>Zellkultur</b> .....	<b>107</b>
7.2.1	Allgemeine Techniken .....	107
7.2.2	Zelllinien .....	108
7.2.3	Hippokampale Primärkulturen .....	108
7.2.4	DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mit Lipofectamin.....	108
7.2.5	DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mit Elektroporation.....	108
7.3	<b>Manipulation und Zucht von Mäusen</b> .....	<b>108</b>
7.3.1	Mikroinjektion von DNA in befruchtete Oozyten .....	109
7.3.2	Schwanzbiopsien.....	109
7.4	<b>Histologische und immunhistochemische Methoden</b> .....	<b>109</b>
7.4.1	Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion.....	109
7.4.2	Herstellung von Vibratomschnitten .....	109
7.4.3	Herstellung von Paraffinschnitten .....	110

---

7.4.4	Herstellung von Kryostatschnitten .....	110
7.4.5	Herstellung von Semi-Dünnschnitten .....	110
7.4.6	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung .....	111
7.4.7	TUNEL-Färbung .....	111
7.4.8	Histochemische Analyse der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität auf Vibratom- und Kryostatschnitten .....	111
7.4.9	Immunhistochemische Analyse auf Vibratom- und Kryostatschnitten .....	111
7.4.10	Immunhistochemische Analyse auf Paraffinschnitten .....	111
7.4.11	Immunzytochemische Analyse von Zellkulturen .....	112
<b>7.5</b>	<b>Detektion von mRNA mittels <i>in situ</i> Hybridisierung .....</b>	<b>112</b>
7.5.1	Sondenherstellung .....	113
7.5.2	Restriktionsverdau zur Linearisierung der Plasmide .....	113
7.5.3	<i>In vitro</i> Transkription zur Markierung der Sonden .....	113
7.5.4	Hydrolyse der cRNA .....	113
7.5.5	Aufreinigung der RNA-Sonden .....	114
7.5.6	Chromogene <i>in situ</i> Hybridisierung (CISH) .....	114
<b>7.6</b>	<b>Western Blot Analyse .....</b>	<b>114</b>
7.6.1	Herstellung von Proteinextrakten .....	114
7.6.2	Bestimmung des Proteingehaltes .....	115
7.6.3	Probenvorbereitung .....	115
7.6.4	Gelelektrophorese und Elektrotransfer .....	115
<b>7.7</b>	<b>Elektrophysiologie .....</b>	<b>116</b>
7.7.1	Präparation von lebenden Gehirnschnitten .....	116
7.7.2	Extrazelluläre Messung von hippokampalen Schnitten .....	116
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>119</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Varianten des humanen Neuregulin 1 (NRG1) Gens, das für eine Familie neuronaler Wachstumsfaktoren kodiert, erhöhen vermutlich das Risiko an Schizophrenie (SZ) zu erkranken. Der maßgebliche NRG1-Rezeptor im Zentralnervensystem (ZNS) ist die membranständige Tyrosinkinase ErbB4, die ebenfalls einen potentiellen Risikofaktor für die Ausbildung von SZ darstellt. Dem NRG1-ErbB4-Signalweg wird eine Reihe von Funktionen zugeschrieben, z. B. bei der Migration kortikaler Interneurone und der Regulation synaptischer Plastizität. Da Nullmutanten des ErbB4- bzw. NRG1-Gens bereits während der Embryonalentwicklung sterben, ist die ErbB4-Funktion im adulten Gehirn noch nicht genau verstanden. Zur genaueren Untersuchung der Rolle von ErbB4 im adulten Gehirn wurden im Rahmen dieser Studie konditionale, zelltyp-spezifische Mausmutanten des ErbB4-Gens hergestellt und die Auswirkungen der ErbB4-Mutation auf die adulte Gehirnfunktion näher untersucht.

Bei der Analyse einer Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante, in welcher der Verlust der ErbB4-Funktion erst postnatal einsetzt, wurden keine deutlichen Veränderungen in der Gehirnentwicklung oder Unterschiede in der Transkription von Neurotransmitter-Rezeptoren beobachtet. Elektrophysiologische Untersuchungen wiesen zudem eine unbeeinträchtigte Ausbildung synaptischer Plastizität im Hippokampus nach. Eine anschließende Expressionsanalyse mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen, Immunfärbungen und Einzellzell-PCR ergab, dass ErbB4-mRNA hauptsächlich in Parvalbumin (PV)-exprimierenden Interneuronen vorlag, während in Pyramidenzellen nur in einzelnen Fällen geringe Mengen ErbB4-mRNA nachgewiesen werden konnte.

Diese Befunde führten zur Herstellung einer Mausmutante, in der ein selektiver, postnatal einsetzender Verlust der ErbB4-Funktion in PV-exprimierenden Interneuronen vorlag. Bei der Analyse dieser Mutante wurden ebenfalls keine Veränderungen in der Gehirnentwicklung, der Anzahl kortikaler, PV-exprimierender Interneurone oder der Transkription von Neurotransmitter-Rezeptoren beobachtet. Die Auswirkung des selektiven Verlusts der ErbB4-Funktion in PV-exprimierenden Interneuronen wird z.Z. mit Hilfe von elektrophysiologische Untersuchungen und Verhaltenstests analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen daraufhin, dass ErbB4 im adulten Gehirn synaptische Plastizität in Interneuronen moduliert. Eine Beeinträchtigung synaptischer Funktionen aufgrund chronischer Veränderungen des NRG1-ErbB4-Signalwegs könnte zur Entstehung von SZ beitragen.

Die vorhandenen NRG1-spezifischen Antikörper sind für eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation oder des Prozessierungsmusters von NRG1 im Nervensystem nicht geeignet. Daher wurde in einem Nebenprojekt eine transgene Mauslinie hergestellt, die Hämagglutininepitop (HA)-markiertes NRG1 typ III neuronal überexprimiert. Die N-terminale HA-Markierung beeinträchtigt nicht die *in vivo*-Funktion von NRG1, denn transgene Mäuse weisen eine deutliche Hypermyelinisierung im PNS und ZNS auf. Diese transgene Mauslinie stellt daher ein wichtiges Werkzeug dar, um die subzelluläre Lokalisation, den Transport und die proteolytische Prozessierung von NRG1 typ III genauer zu untersuchen.

## 2 SUMMARY

The human Neuregulin 1 (NRG1) gene, which encodes a family of neuronal growth factors, has been identified as a susceptibility gene for schizophrenia (SZ). ErbB4, a transmembrane tyrosine kinase, is the predominant NRG1 receptor in the central nervous system (CNS) and might also represent a SZ susceptibility gene. Multiple functions of NRG1-ErbB4 signaling have been suggested, including a role in migration of cortical interneurons and synaptic plasticity. However, *in vivo* data for the adult brain are limited, due to the embryonic lethality of NRG1 and ErbB4 null mutations in mice. Moreover, the exact ErbB4 expression profile in the adult brain has not been properly defined. To better understand ErbB4 function in the adult brain, we have generated cell type-specific mouse mutants of the ErbB4 gene and studied the effects of a postnatal loss of ErbB4 on cortical development and synaptic plasticity.

Conditional null mutants lacking ErbB4 in cortical projection neurons beginning at postnatal stages (using a CamKII-Cre driver line) develop normally and exhibit no obvious defects in cortical development. Moreover, cortical expression levels of AMPA and NMDA receptors were unaltered. Electrophysiological analysis revealed largely unaffected synaptic plasticity in the hippocampus of projection neuron-specific ErbB4 mutants. Subsequent expression analysis by *in situ* hybridization, immunostaining, and single cell-PCR demonstrated that ErbB4 mRNA is predominantly located in parvalbumin (PV) expressing interneurons, in contrast, ErbB4 expression was only very rarely detected in pyramidal cells.

Using a PV-Cre driver line, we next generated mice lacking ErbB4 selectively in PV-expressing interneurons, again beginning at postnatal stages. These mouse mutants did not display obvious histological abnormalities. Numbers of cortical PV-expressing interneurons as well as cortical expression levels of AMPA and NMDA receptors were unaltered. Currently ongoing analyses focus on the consequences of a PV interneuron-specific lack of ErbB4 on synaptic structure, hippocampal synaptic plasticity, and behavior. We suggest that ErbB4 signaling in the mature brain modulates synaptic functions, most likely acting through an interneuronally expressed ErbB4 receptor. Impaired synaptic plasticity as a consequence of chronic alterations in the level of NRG1-ErbB4 signaling might contribute to the pathophysiology of SZ.

In the absence of appropriate NRG1 antibodies little is known about the processing and subcellular localization of NRG1 *in vivo*. Therefore, in a side project we have generated a transgenic mouse line expressing N-terminally hemagglutinin epitope (HA)-tagged NRG1 type III under control of a neuron-specific promoter. Analyses of these transgenic mice revealed significant hypermyelination in the CNS and PNS, thus demonstrating an unaltered function of HA-tagged NRG1 type III. This transgenic mouse line will be an excellent tool to study proteolytic processing, transport, and subcellular localization of NRG1 type III in the nervous system.

### 3 EINLEITUNG

Das menschliche Gehirn besteht aus ca.  $10^{11}$  Nervenzellen (Neuronen), die miteinander zu neuronalen Netzwerken verschaltet sind. Neuronale Netzwerke ermöglichen die Wahrnehmung, ein Bewusstsein, Erkenntnis und vorsätzliche Handlungen. Präzise in lokalen anatomischen Einheiten organisiert, kommunizieren Nervenzellen über insgesamt  $10^{14}$  bis  $10^{15}$  Synapsen. Die Purkinje-Zellen des Kleinhirns z.B. erhalten dabei bis zu 150.000 synaptische Kontakte auf ihre großen Dendritenbäume [Kandel et al. 2000]. Für das komplexe menschliche Verhalten ist neben der Spezialisierung der einzelnen Nervenzelle insbesondere ihre die Verschaltung zu Netzwerken entscheidend. Während der Entwicklung und Regeneration, sowie durch Erfahrungen und Lernen können synaptische Eigenschaften durch neuronale Aktivität modifiziert werden. Langfristig kommt es dabei zu anatomische Veränderungen, wie z.B. der Bildung neuer synaptischer Verbindungen [Kandel et al. 2000]. Obwohl allen Neuronen ein gemeinsamer Bauplan zu Grunde liegt, können sie aufgrund morphologischer Unterschiede in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Es existieren drei funktionelle Hauptgruppen. Primäre sensorische afferente Neurone liefern dem Nervensystem Informationen von der (Körper-) Peripherie wie der Haut oder der Retina. Motorneurone leiten Befehle zu Muskeln oder Drüsen weiter und werden auch als efferente Neurone bezeichnet. Die Mehrheit sind jedoch Interneurone, die ausschließlich Kontakte mit anderen Neuronen eingehen. Sie werden unterteilt in lokale Interneurone mit kurzen Axonen und Projektions-Interneurone, die Informationen über längere Distanzen vermitteln [Kandel et al. 2000].

#### 3.1 Exzitatorische Neurone

Die meisten Projektions-Interneurone sind exzitatorische Pyramidenzellen, benannt nach der Form ihres Zellkörpers. Dabei besitzen neokortikale Pyramidenzellen relativ stereotype anatomische, physiologische und molekulare Eigenschaften [Markram et al. 2004]. Häufig besitzen Pyramidenzellen zwei dendritische Bäume; die basalen Dendriten entspringen auf der Seite des Zellkörpers, aus dem auch das Axon entspringt, die apikalen Dendriten auf der gegenüberliegenden Seite des Zellkörpers. Aber auch die kleinen, multipolaren Körnerzellen des Gyrus Dentatus oder Kleinhirns gehören zur Klasse der Projektions-Interneurone.

Der häufigste exzitatorische Neurotransmitter ist L-Glutamat. Die drei Haupttypen von ionotropen Glutamatrezeptoren sind der AMPA- ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid), der Kainat- und der NMDA- (N-methyl-D-aspartat) Rezeptor. Diese wurden jeweils nach dem synthetischen Agonisten benannt, der sie aktiviert. Die ligandenabhängige Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einem  $\text{Na}^+$ -Ionen Einstrom, der eine Depolarisierung

der postsynaptischen Membran bewirkt. Diese synaptischen Potentiale werden passiv zum Axonhügel weitergeleitet. Die neuronale Integration exzitatorischer (und inhibitorischer) synaptischer Potentiale entscheidet über die Ausbildung eines Aktionspotentials.

Projektions-Interneurone sind über zahlreiche Synapsen miteinander verbunden. Die Dendriten der meisten Neurone bilden dabei spezialisierte Mikrodomänen aus, die dendritischen Dornen (Spines). Charakteristisch für die exzitatorische Postsynapse ist eine ausgeprägte PSD (*postsynaptic density*) gegenüber der präsynaptischen aktiven Zone. Die PSD enthält Neurotransmitter-Rezeptoren, Ionen-Kanäle und Enzyme, die zur Signalweiterleitung an der Synapse beitragen [Kennedy 1997; Ziff 1997]. Dabei spielt PSD95 (*postsynaptic density protein of 95 kDa*), ein an der PSD angereichertes Protein, eine wichtige Rolle bei der molekularen Organisation des postsynaptischen Komplexes. Glutamaterge Synapsen werden nicht nur mit anderen Pyramidenzellen gebildet, sondern auch mit inhibitorischen Interneuronen, wobei die Innervation meiste an Dendriten stattfindet [Markram et al. 2004]. Zudem erhalten Pyramidenzellen Synapsen von inhibitorischen Interneuronen, wobei die inhibitorischen Synapsen nicht nur mit den Dendriten und Spines der Pyramidenzellen, sondern auch mit dem Soma und dem Initialsegment des Axons geformt werden [Freund and Buzsaki 1996; Benes and Berretta 2001]. Etwa 16% aller Synapsen auf kortikalen Pyramidenzellen werden von inhibitorischen Interneuronen gebildet, trotzdem ist der genaue Aufbau inhibitorischer Synapsen weniger untersucht [Markram et al. 2004]. Allerdings wurden in den letzten Jahren einige Zell Adhäsions-Moleküle (z.B Neurexin/Neuroigin) entdeckt, die möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Ausbildung dieser Synapsen und der GABergen Transmission spielen [Craig and Kang 2007].

### **3.2 Diversität der inhibitorischen Interneurone**

20-30% der neokortikalen Neurone sind inhibitorische Interneurone, die bezüglich ihrer morphologischen, physiologischen, molekularen und synaptischen Eigenschaften sehr variabel sind [Ascoli et al. 2008]. Es existieren aber auch einige Gemeinsamkeiten. So gehören sie meist zur Gruppe der lokalen Interneurone. Viele dieser inhibitorischen Interneurone bilden keine dendritischen Dornen aus, sondern besitzen glatte Dendriten. Zudem können Interneurone sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Synapsen auf dem Soma enthalten. Der häufigste inhibitorische Neurotransmitter ist GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), der an ionotrope GABA<sub>A</sub>- und metabotrope GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren bindet [Kandel et al. 2000]. Daneben verwenden einige inhibitorische Interneurone Glycin als Neurotransmitter. Im Folgenden werden inhibitorische Interneurone zur Vereinfachung nur noch als Interneurone bezeichnet.

Eine Einteilung in verschiedene Klassen ist aufgrund der Vielfältigkeit der Interneurone schwierig. Alleine im Hippokampus wurden bis zu sechzehn Interneuron-Typen identifiziert, von denen zwölf hauptsächlich Pyramidenzellen und vier überwiegend andere Interneurone innervieren [Somogyi and Klausberger 2005]. Unterschiedliche Eigenschaften der Interneurone können zur Klassifizierung verwendet werden, wie z.B. die Innervation verschiedener Subdomänen von Pyramidenzellen, molekulare Expressionsprofile oder elektrischen Eigenschaften [Klausberger and Somogyi 2008]. Ein Großteil der Interneurone innerviert nur bestimmte Domänen der Pyramidenzellen. So wurden Korbzellen beschrieben, die überwiegend Synapsen mit dem Soma und den proximalen Dendriten von Pyramidenzellen bilden. Die Bezeichnung dieser Zellen kommt von der Korb-ähnlichen Form der Synapsen vieler Interneurone um das Pyramidenzell-Soma. Korbzellen können zudem in Große-, Kleine- und Nest-Zellen unterteilt werden [Markram et al. 2004]. Eine weitere Klasse bilden die „*Chandelier*“-Zellen. Diese Interneurone innervieren hauptsächlich den Axonhügel und das Initialsegment des Pyramidenzell-Axons [Somogyi 1977]. Dagegen formen „*Neuroglia-form*“- und „*Double-bouquet*“-Zellen Synapsen mit den Dendriten der pyramidalen Neurone [Benes and Berretta 2001; Markram et al. 2004]. Die Pyramidenzellen der CA1-Region erhalten auf dem Soma und dem Initial-Segment des Axons ausschließlich inhibitorische Synapsen. Interneurone können auch aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften klassifiziert werden. So dient z.B. die Expression von Calcium-bindenden Proteinen (Parvalbumin (PV), Calretinin, Calbindin) oder von Neuropeptiden (Somatostatin, Cholecystinin (CCK), Neuropeptid Y) als Klassifizierungsmerkmal [Freund and Buzsaki 1996]. „*Double-bouquet*“-Zellen des Neokortex exprimieren z.B. meist Calbindin, während Somatostatin in „*Martinotti*“-Zellen exprimiert wird [DeFelipe 1997; Markram et al. 2004]. Die elektrischen Eigenschaften von Interneuronen können ebenfalls zur Einteilung in verschiedene Klassen verwendet werden. Dabei reicht mittlerweile eine einfache Gliederung in „*fast spiking*“, „*bursting*“ oder „*regular spiking*“ nicht mehr aus [Gupta et al. 2000; Kawaguchi and Kondo 2002]. Für eine detaillierte Berücksichtigung elektrischer Merkmale wurden Interneurone inzwischen in fünf Gruppen und weiteren Untergruppen eingeteilt [Markram et al. 2004]. Dabei kommt es häufig zur Überschneidung der zur Klassifizierung herangezogenen Merkmale. Nur in sehr seltenen Fällen schließen sich Eigenschaften gegenseitig aus. Eine Ausnahme stellt die Expression von PV und CCK dar, denn Korbzellen exprimieren jeweils nur einen dieser Marker [Somogyi and Klausberger 2005].

Pyramidenzellen innervieren vorwiegend die Dendriten von Interneuronen. Nur wenige exzitatorische Synapsen werden mit dem Soma gebildet [Markram et al. 2004]. Die Pyramidenzell-Interneuron Synapsen besitzen eine besonders schnelle Kinetik [Geiger et al. 1997]. Diese beruht u. a. darauf, dass sich die Glutamat-Rezeptoren der postsynaptischen Interneurone aus anderen Untereinheiten zusammensetzen als die der Pyramidenzellen. So enthalten die AMPA-Rezeptoren sehr häufig die GLUR4-Untereinheit in der flop Form [Geiger et al. 1995]. Dadurch zeigen die AMPA-Rezeptoren der Interneurone eine doppelt so

schnelle Deaktivierung und eine dreifach schnellere Desensibilisierung, wodurch sich der zeitliche Verlauf der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC; *excitatory postsynaptic currents*) beschleunigt [Geiger et al. 1997]. GLUR4 wird in Pyramidenzellen dagegen nur in frühen Stadien der Entwicklung exprimiert [Zhu et al. 2000].

Aufgrund der Vielfalt der Interneurone existiert eine enorme Anzahl an gegenseitigen Verbindungsmöglichkeiten. Allerdings formen Interneurone untereinander sehr viel seltener Synapsen und nicht jeder Interneuron-Typ ist mit allen Interneuron-Typen verbunden. So scheinen „*Chandelier*“-Zellen z.B. nur Pyramidenzellen zu innervieren [DeFelipe 1997; Zhu et al. 2000; Somogyi and Klausberger 2005]. Einige Korbzellen bilden dagegen zahlreiche, gegenseitige Synapsen aus, wodurch GABAerge Netzwerke entstehen. Teilweise sind diese sogar über *Gap junctions* elektrisch miteinander gekoppelt [Bartos et al. 2002]. „*Double-bouquet*“-Zellen interagieren wiederum nur selten untereinander [Markram et al. 2004].

PV wird hauptsächlich in „*Chandelier*“-Zellen und Korbzellen exprimiert, die das Initialsegment des Axons bzw. das Soma der Pyramidenzellen innervieren. Dadurch können diese Interneurone sehr direkt auf die Aktivität der Pyramidenzellen einwirken und so die Ausbildung und die zeitliche Koordination von Aktionspotentialen regulieren. PV positive Interneurone zeigen meist ein „*fast spiking*“ Aktivitätsmuster. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Synchronisation der neuronalen Aktivität von Pyramidenzellen, die der Ausbildung von  $\gamma$ -Oszillation (30-90 Hz) zugrunde liegt [Bartos et al. 2007]. Die ausgeprägten interneuronalen Verbindungen der Korbzellen, sowie die schnelle gegenseitige Inhibierung und Aktivierung der PV positiven Interneurone sind dafür besonders wichtige Eigenschaften. Die rhythmische Netzwerkaktivität von kortikalen Neuronen umfasst eine große Bandbreite von Frequenzen, von langsamen delta (0,5-3 Hz) und theta (3-8 Hz) bis hin zu schnellen gamma (30-90 Hz) und „ultra schnellen“ (90-200 Hz) Oszillationen [Bartos et al. 2007]. Dabei spielen diese Netzwerkaktivitäten möglicherweise eine wichtige Rolle bei kognitiven Prozessen, da sie abhängig vom Verhalten beobachtet wurden [Buzsaki and Draguhn 2004]. So können viele Hirnregionen Oszillationen erzeugen, wie z.B. der Olfaktorische Bulbus, Thalamus, Hippokampus und Neokortex [Bartos et al. 2007], wobei die Aktivität der verschiedenen Hirnregionen miteinander koordiniert wird. Wie diese Interaktion und zeitliche Organisation der Netzwerk-Oszillation erfolgt, ist bisher noch unklar. Es liegt jedoch nahe, dass gegenseitige Verbindungen der Hirnregionen daran beteiligt sind [Mann and Paulsen 2007].

An der Ausbildung von Synapsen und der Regulation synaptischer Plastizität spielen u. a. Zell-Adhäsions-Moleküle eine wichtige Rolle, wie z.B. Ephrin/Eph- und Neurexin/Neuroigin-Komplexe. Verschiedene Aspekte der Synapsen-Struktur und Physiologie können durch Ephrin/Eph-Interaktionen reguliert werden. So können sie morphologische Veränderungen der Postsynapse hervorrufen, sowie die subzelluläre Lokalisation und die Aktivität von NMDA- und AMPA-Rezeptoren beeinflussen [Murai and Pasquale 2004]. Die Neurexin/Neuroigin-Komplexe sind maßgeblich an der Differenzierung der Prä- und

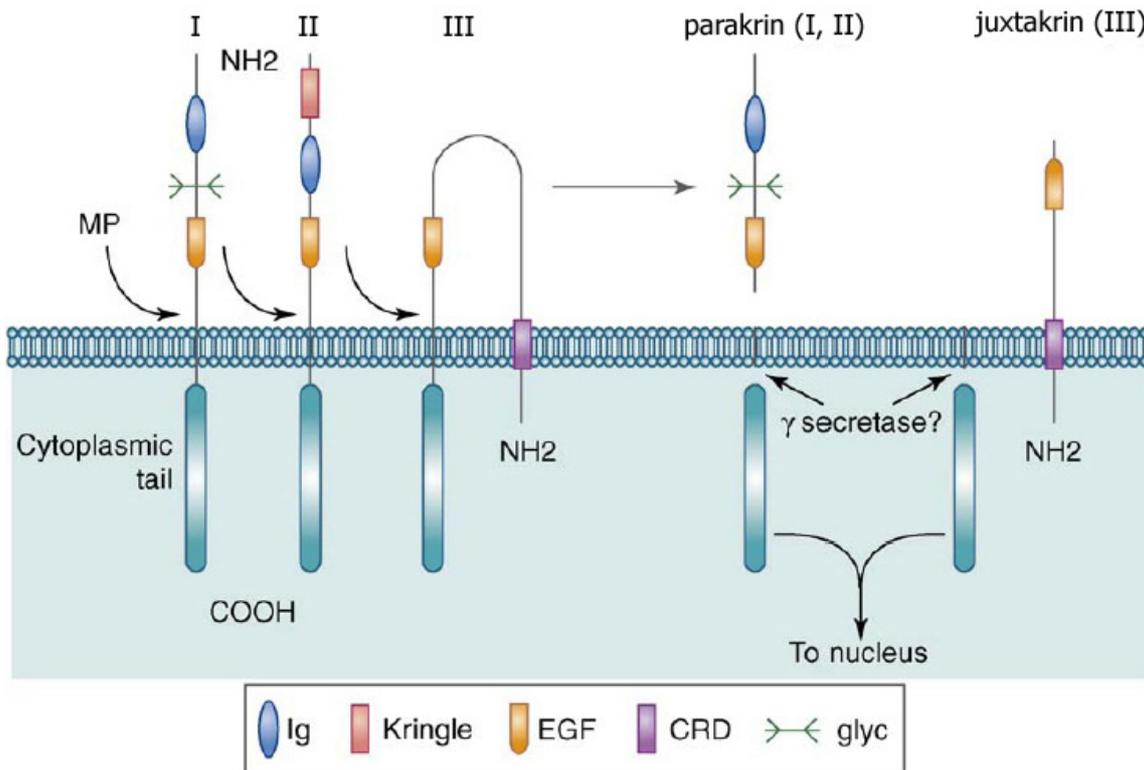
Postsynapse beteiligt und können die Freisetzung präsynaptischer Neurotransmitter beeinflussen [Craig and Kang 2007; Gottmann 2008]. Ein weiteres Liganden-Rezeptorpaar, das möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Synaptogenese und der Modulation synaptischer Eigenschaften spielt, ist das Neuregulin-ErbB-Signalsystem.

### 3.3 Die Neuregulin-Familie

Die Neureguline (NRG) sind strukturell verwandte Wachstumsfaktoren, die jeweils eine EGF-ähnliche Domäne enthalten. Diese Domäne ist sowohl notwendig als auch ausreichend für die Aktivierung von transmembranen Tyrosinkinase der ErbB-Rezeptor-Familie (ErbB1-4) [Buonanno and Fischbach 2001]. Neureguline beeinflussen die Zell-Zell Wechselwirkungen im Nervensystem, Herz, Brust und anderen Organsystemen [Falls 2003]. In Vertebraten sind derzeit vier verschiedenen Neuregulin Gene bekannt. Die Sequenz und Struktur von NRG1 und NRG2 sind relativ ähnlich, während NRG3 und NRG4 nur geringe Ähnlichkeiten mit NRG1 aufweisen [Buonanno and Fischbach 2001]. NRG1 und NRG2 binden und aktivieren sowohl ErbB3 als auch ErbB4 [Carraway et al. 1997]. Dagegen bevorzugen NRG3 und NRG4 den ErbB4 Rezeptor [Zhang et al. 1997; Harari et al. 1999]. Die Interaktion verschiedener Neureguline mit demselben Rezeptordimer führt dabei zur Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege [Sweeney et al. 2000; Buonanno and Fischbach 2001]. NRG1 wird in Neuronen und Gliazellen, sowie im Herzen, der Leber, Magen, Lunge, Niere, Milz und Haut exprimiert [Wen et al. 1994]. Das Expressionsmuster der anderen Wachstumsfaktoren ist begrenzter. So wird NRG2 überwiegend im ZNS und dem Herzen exprimiert [Buonanno and Fischbach 2001]. Die NRG3 Expression beschränkt sich auf das Nervensystem und NRG4 wurde vor allem im Pankreas und im Skelettmuskel nachgewiesen [Zhang et al. 1997; Harari et al. 1999]. Die Expression der Wachstumsfaktoren in verschiedenen Regionen, sowie die unterschiedliche Aktivierung von Signalwegen weist auf spezifische biologische Rollen der einzelnen Neureguline hin.

Die Funktion von NRG1 ist am besten untersucht. Mindestens 15 verschiedene Isoformen werden durch das Verwenden verschiedener Promotoren und alternativem Splicen der NRG1 mRNA exprimiert [Falls 2003]. Diese werden in drei Gruppen unterteilt, basierend auf der Struktur des N-Terminus (Abb.1). NRG1 typ I und NRG1 typ II besitzen N-terminale Ig-(Immunglobulin) ähnliche Domänen und nur eine Transmembranregion. Die membrangebundenen (Pro-)Proteine können von BACE ( *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme*) oder der Metalloprotease TACE (*tumor-necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*) proteolytisch prozessiert werden [Horiuchi et al. 2005; Hu et al. 2008]. Dadurch können beide Isoformen von der neuronalen Zelloberfläche freigesetzt werden und als parakrine Signale wirken. Die NRG1 typ III-Isoform besitzt N-terminal eine Cystein-reiche Domäne (CRD), die als zweite Transmembrandomäne fungiert. Daher ist NRG1 typ III auch nach der proteolytischen

Prozessierung noch an die Zellmembran gebunden und agiert vermutlich als juxtakrines Signal [Nave and Salzer 2006]. Allerdings gibt es Vermutungen, dass diese Isoform einer weiteren Prozessierung unterliegt, so dass ein Fragment freigesetzt wird, das die EGF-Domäne enthält [Frenzel and Falls 2001].



**Abb.1 Neuregulin 1-Isoformen**

Schematische Darstellung der NRG1-Isoformen. NRG1 typ I und NRG1 typ II besitzen nur eine Transmembrandomäne. NRG1 typ III enthält dagegen eine Cystein-reiche Domäne (CRD), die als zweite Transmembrandomäne fungiert. Proteolytische Prozessierung durch Metalloproteasen (MP) bewirkt eine Freisetzung der N-terminalen Domänen von NRG1 typ I und NRG1 typ II, die parakrin agieren. NRG1 typ III bleibt hingegen nach der proteolytischen Prozessierung weiterhin membrangebunden und wirkt als juxtakrines Signal. Eine weitere Prozessierung der zytoplasmatischen Domäne wird vermutet, gefolgt von einem Transport dieser Domäne in den Zellkern (verändert nach Nave und Salzer, 06).

Es gibt Hinweise darauf, dass der NRG-ErbB-Signalweg nicht nur in Richtung der ErbB4-Rezeptor tragende Zelle verläuft, sondern auch in die Liganden-exprimierende Zelle zurückwirkt. So wurde beobachtet, dass die Bindung von ErbB4 an membrangebundenes NRG1 typ III in transfizierten Zellen zur proteolytischen Prozessierung und Freisetzung des zytoplasmatischen C-Terminus führt [Bao et al. 2003]. Dieses NRG1-Fragment wird anschließend in den Zellkern transportiert und unterdrückt dort die Expression von verschiedenen Apoptose regulierenden Proteinen. In der Cochlea der Maus führt

synaptische Aktivität zur Anreicherung der intrazellulären NRG1-Domäne im Zellkern [Bao et al. 2004]. Eine Interaktion mit dem Zink-Finger Transkriptionsfaktor Eos verursacht hierbei eine Steigerung der PSD95-Expression. Welche Rolle dieser (rückwärts-gerichtete) Signalweg *in vivo* spielt, ist bisher nicht bekannt. Wesentlich besser verstanden ist hingegen die Rolle des NRG1-ErbB-Signalwegs bei der Entwicklung von Neuralleistenzellen (*neural crest cell*), der Proliferation von Schwann-Zellen und der Myelinisierung im PNS.

### 3.4 Myelin und die Funktion von Neuregulin 1

Aktuelle Studien zeigen, dass NRG1 typ III bei der terminalen Differenzierung von Schwann-Zellen und der Myelinisierung im PNS eine entscheidende Rolle spielt [Michailov et al. 2004; Taveggia et al. 2005]. Bei einer Analyse von Mausmutanten mit erhöhter oder verringerter NRG1-Expression wurden Veränderungen der Myelindicke beobachtet [Michailov et al. 2004]. Mausmutanten mit einer reduzierten NRG1-Expression weisen dünnere Myelinscheiden und eine langsamere Nervenleitungsgeschwindigkeit auf, ohne dass Veränderung bei der Axongröße oder der Anzahl von Schwann-Zellen auftraten. Gleichzeitig wurde eine Hypermyelinisierung in Mutanten beobachtet, die NRG1 typ III neuronal überexprimierten. In einer weiteren Studie wurden Ko-Kulturen von dorsalen Wurzelganglien (DRG; *dorsal root ganglia*) und Schwann-Zellen verwendet, um *in vitro* die Ausbildung von Myelin zu untersuchen [Taveggia et al. 2005]. Sensorische Neurone von NRG1 typ III Nullmutanten wurden in diesen Ko-Kulturen nicht myelinisiert. Zusätzlich konnte in dieser Studie durch virale Expression von NRG1 typ III die Myelinisierung von Neuronen des sympathischen Nervensystems induziert werden, die normalerweise nicht myelinisiert sind. Ältere Studien deuteten auf eine vergleichbare Funktion von NRG1 im ZNS hin [Vartanian et al. 1999; Fernandez et al. 2000]. So wurde eine gestörte Entwicklung von Oligodendrozyten in Rückenmarkschnittkulturen von NRG1 Nullmutanten beobachtet [Vartanian et al. 1999]. Zudem wurde in Oligodendrozyten-Kulturen vom optischen Nerv gezeigt, dass die Inaktivierung von NRG1 durch einen dominant-negativen ErbB4-Rezeptor zu einer deutlich verstärkten Apoptose führte [Fernandez et al. 2000]. Kürzlich wurden mehrere Studien veröffentlicht, in denen die Funktion von NRG1 bei der Myelinisierung des ZNS *in vivo* untersucht wurde. Die Expression einer dominant-negativen ErbB4-Variante unter einem Oligodendrozyten-spezifischen Promotor führte in transgenen Mäusen zu einer erhöhten Anzahl und veränderten Morphologie von Oligodendrozyten sowie einer Hypomyelinisierung im ZNS [Roy et al. 2007]. Im Gehirn von heterozygoten NRG1 typ III-spezifischen Mausmutanten wurde ebenfalls teilweise eine moderate Hypomyelinisierung nachgewiesen. Die virale Expression von NRG1 typ III konnte jedoch keine Myelinisierung von Neuronen des sympathischen Nervensystems bewirken [Taveggia et al. 2008]. In einer anderen Studie wurde dagegen keine Veränderung der Myelindicke in diesen Mausmutanten beobachtet

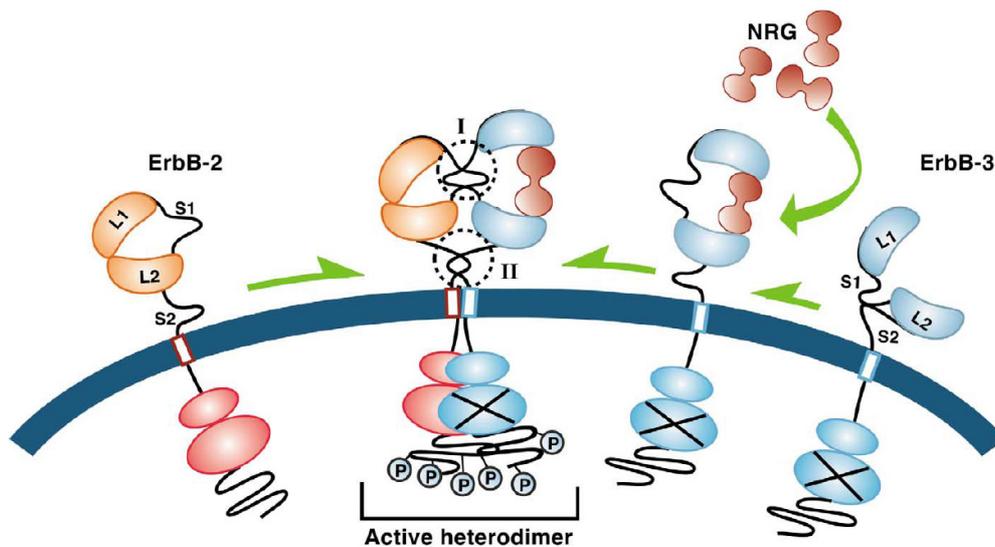
[Brinkmann et al. 2008]. Zudem zeigte die Analyse verschiedener konditionaler Nullmutanten des NRG1-Gens eine normale Myelinisierung im ZNS. Die neuronale Überexpression von NRG1 typ I oder NRG1 typ III in transgenen Mäusen bewirkte aber eine Hypermyelinisierung im ZNS [Brinkmann et al. 2008]. Diese Studien zeigen, dass NRG1 typ III unterschiedliche Rollen bei der Myelinisierung des PNS und ZNS spielt.

### 3.5 Die ErbB-Rezeptor-Familie

Die ErbB-Familie membranständiger Rezeptor-Tyrosinkinasen besteht aus vier Mitgliedern (ErbB1-4). Ursprünglich benannt wurden diese membranständigen Proteine aufgrund der Ähnlichkeit mit dem Gen-Produkt des *erythroblastosis Tumor Virus* (v-erbB). Die vier ErbB Rezeptoren erkennen zusammen mindestens elf verschiedenen Liganden, z.B. EGF (Epidermiswachstumsfaktor; *epidermal growth factor*), Betacellulin, Epiregulin sowie NRG1-4. Den vier Rezeptoren liegt eine gemeinsame Struktur zugrunde. Der große, stark glykolysierte extrazelluläre N-Terminus dient der Bindung von Liganden und ist in vier Subdomänen unterteilt. Die Cystein-reichen Domänen II und IV bilden miteinander 25 Disulfid-Brücken aus und spielen bei der Dimerisierung eine wichtige Rolle. Alle Rezeptoren besitzen zudem eine Transmembrandomäne sowie eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne, gefolgt von einer Reihe potentieller Tyrosin-Phosphorylierungsstellen [Linggi and Carpenter 2006]. Die Bindung eines Liganden bewirkt eine Konformationsänderung der Rezeptoren, die den Dimerisierungsarm zugänglich macht [Burgess et al. 2003] (Abb.2). Dabei führt die Ligandenbindung zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren, wobei nur ErbB1 und ErbB4 Homodimere ausbilden können [Berger et al. 2004; Citri and Yarden 2006]. Eine Ausnahme bildet der ErbB2-Rezeptor, der keine Liganden direkt binden kann [Klapper et al. 1999]. Die Konformation von ErbB2 ermöglicht aber auch ohne Ligandenbindung eine Dimerisierung (Abb.2). Gleichzeitig ist ErbB2 der bevorzugte Heterodimerisierungspartner der anderen ErbB-Rezeptoren [Graus-Porta et al. 1997]. Heterodimere, die diesen Rezeptor enthalten, besitzen eine höhere Affinität zu den Liganden, da die Rezeptor-Liganden-Komplexe langsamer dissoziieren [Citri et al. 2003]. Außerdem wurde beobachtet, dass der Dimerisierung-Partner durch die Interaktion mit ErbB2 zusätzliche Liganden erkennen und binden kann [Citri et al. 2003]. Einige *in vitro* Studien zeigten zudem, dass die Endozytose bei ErbB2-enthaltenden Rezeptor-Dimeren langsamer erfolgt; außerdem wurden diese häufiger rezykliert und wieder in die Zellmembran eingebaut [Baulida et al. 1996; Lenferink et al. 1998].

Die Dimerisierung der Rezeptoren führt zu einer Autophosphorylierung von C-terminalen Tyrosin-Resten. Dadurch werden Bindestellen für verschiedene Adapterproteine (z.B. Shc, Grb2), Kinasen (z.B. Src, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K)) und Tyrosin-Phosphatasen (SHP1, SHP2) geschaffen [Olayioye et al. 2000]. Welche Tyrosin-Reste phosphoryliert und

welche Adapterproteine rekrutiert werden, ist sowohl vom Liganden als auch vom Dimerisierungs-Partner abhängig [Olayioye et al. 1998; Sweeney et al. 2000]. Durch die Aktivierung verschiedener Signalwege können die ErbB-Rezeptoren u. a. verschiedene Aspekte der neuronalen und kardiovaskulären Entwicklung beeinflussen und spielen zudem eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs [Olayioye et al. 2000; Carpenter 2003; Citri et al. 2003].



### Abb.2 Liganden-induzierte ErbB-Rezeptor-Dimerisierung

Schematische Darstellung der Heterodimerisierung von ErbB2 und ErbB3. Die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren besteht aus zwei Cystein-reichen Domänen (S1 und S2) und zwei Cystein-freien Ligandenbindungs-Domänen (L1 und L2). Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, wodurch der Dimerisierungsarm zugänglich wird. Die Konformation von ErbB2 ermöglicht eine Dimerisierung ohne vorherige Ligandenbindungen (verändert nach Citri et al., 03).

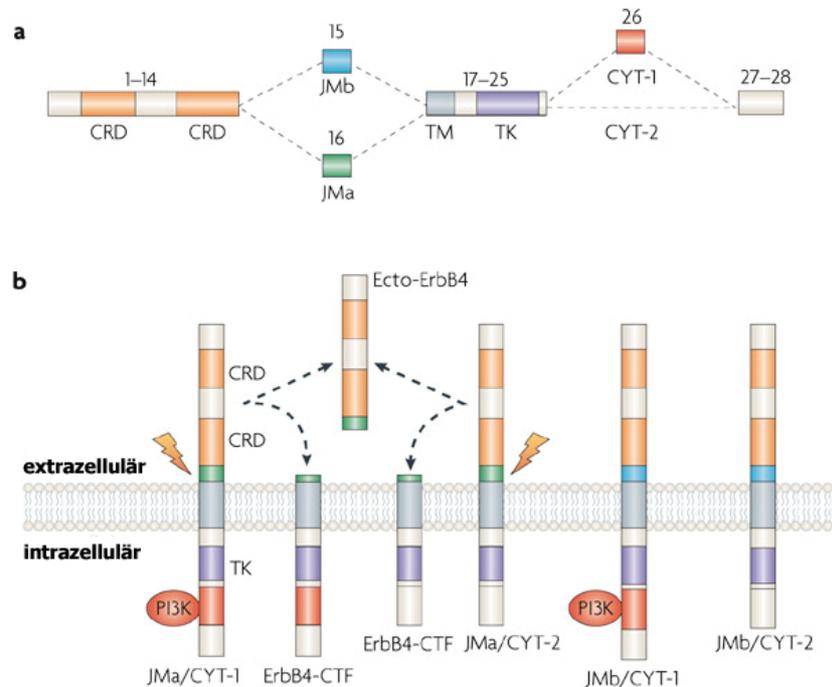
Eine weitere Besonderheit der ErbB-Familie stellt die enzymatisch inaktive Tyrosin-Kinase von ErbB3 dar. Diese enthält im Vergleich zu den anderen ErbB-Rezeptoren Punktmutationen in der katalytischen Domäne [Guy et al. 1994]. Daher kann ErbB3 nur durch Heterodimerisierung mit den anderen Rezeptoren Signale weiterleiten. Obwohl ErbB2 und ErbB3 alleine inaktiv sind, bilden sie zusammen zumindest *in vitro* den potentesten Dimer der ErbB-Rezeptor-Familie bezüglich Zell-Wachstum und Zell-Transformation [Wallasch et al. 1995; Pinkas-Kramarski et al. 1996]. *In vivo* spielen ErbB2 und ErbB3 eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Schwann-Zellen und der Myelinisierung des PNS [Citri et al. 2003; Nave and Salzer 2006].

### 3.6 Der ErbB4-Rezeptor

ErbB4 wurde als bisher letztes Mitglied der ErbB-Familie aus einer menschlichen Brustkrebs-Zelllinie kloniert [Plowman et al. 1993]. Die Struktur und die Eigenschaften dieses 180 kDa großen Rezeptors weisen Ähnlichkeiten mit dem ErbB1 (EGF) -Rezeptor auf [Carpenter 2003]. Der Rezeptor bindet Betacellulin, Epigen, Epiregulin, HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) sowie NRG1-4 [Olayioye et al. 2000]. ErbB4 wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, z.B. im Herzen, Milchdrüse, Niere und in neuralem Gewebe [Elenius et al. 1997; Junntila et al. 2000]. Durch alternatives Splicen werden mindestens vier verschiedene Isoformen gebildet [Elenius et al. 1997; Sawyer et al. 1998; Elenius et al. 1999] (Abb.3). Die Isoformen unterscheiden sich zum einen in einer direkt N-terminal von der Transmembrandomäne gelegenen extrazellulären Region („*juxtamembrane*“ Region) und zum anderen im zytoplasmatischen C-Terminus. Die „*juxtamembrane*“ Region enthält in der ursprünglich entdeckten JMa-Isoform 23 Aminosäuren, während die JMb-Isoform 13 alternative Aminosäuren besitzt [Elenius et al. 1997]. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrer Prozessierbarkeit durch Proteasen, weisen aber keine Unterschiede bei der Liganden-Affinität oder der Tyrosin-Kinase-Aktivität auf. Nur die JMa-Isoform kann von der Metalloprotease TACE (*tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*) proteolytisch prozessiert werden [Rio et al. 2000]. Die Proteolyse kann durch Binden eines Liganden oder durch Protein-Kinase C (PKC) Aktivität hervorgerufen werden [Vecchi et al. 1996; Zhou and Carpenter 2000; Zhu et al. 2000]. Das noch membrangebundene C-terminale ErbB4 Fragment wird möglicherweise von der  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert [Ni et al. 2001]. Hierbei wird eine 80 kDa große intrazelluläre ErbB4 Domäne freigesetzt und anschließend in den Zellkern transportiert. Aktuelle Studien lassen vermuten, dass dieses ErbB4 Fragment als Chaperon agiert und so den Transport der Transkriptionsfaktoren STAT5 (*signal transducer and activators of transcription*) und YAP1 (*Yes-associated protein-1*) in den Zellkern erleichtert [Komuro et al. 2003; Omerovic et al. 2004; Williams et al. 2004].

Die zytoplasmatischen Isoformen CYT1 und CYT2 unterscheiden sich durch eine 16 Aminosäuren lange Sequenz, die lediglich in der CYT1-Isoform vorliegt und eine Bindestelle für die PI3-Kinase enthält [Elenius et al. 1999]. Daher kann nur die ursprünglich entdeckte CYT1-Isoform des Rezeptors die p85 Untereinheit der PI3-Kinase binden. Beide Isoformen können durch Aktivierung des Shc/Ras/MAPK Signalwegs gleichermaßen die Synthese von DNA und Proliferation stimulieren, aber nur die CYT1-Isoform aktiviert auch den PI3-Kinase Signalweg, wodurch sie Chemotaxis und Apoptose reguliert [Kainulainen et al. 2000]. ErbB4 enthält als einziges Mitglied der ErbB-Rezeptor Familie am C-Terminus ein Peptidmotiv (-TVV\*), das die Interaktion mit PDZ-Domänen anderer Proteine vermittelt. Das ~80-90 Aminosäuren große PDZ-Motiv wurde ursprünglich in PSD95 identifiziert [Cho et al. 1992; Kistner et al. 1993]. Eine Kollaboration und Interaktion von ErbB4 mit PSD95 wurde

an der exzitatorischen Postsynapse nachgewiesen [Garcia et al. 2000; Huang et al. 2000; Ma et al. 2003].



### Abb.3 Struktur der vier verschiedenen ErbB4-Isoformen

(a) Durch alternatives Splicing können vier verschiedene ErbB4-Isoformen gebildet werden. Die extrazelluläre „juxtamembrane“ Region wird entweder durch Exon 15 oder Exon 16 kodiert. Die CYT1-Isoform des Rezeptors enthält zusätzlich das Exon 26. (b) Die CYT1-Isoform enthält eine Bindestelle für die PI3-Kinase (PI3K). Die JMa- und JMb-Isoformen zeigen keine unterschiedliche Liganden-Affinität. Allerdings kann nur die JMa-Isoform von der Metalloprotease TACE (*tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*) proteolytisch prozessiert werden (angedeutet durch den Pfeilblitz) (verändert nach Mei und Xiong, 08).

ErbB4 spielt eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären und neuralen Entwicklung, sowie der Differenzierung der Milchdrüse [Gassmann et al. 1995; Long et al. 2003; Tidcombe et al. 2003]. Die ErbB4 Nullmutante stirbt aufgrund eines Herzfehlers bereits am Embryonaltag (E) 10.5 [Gassmann et al. 1995]. Die myocardialen Trabeculae der Herzventrikel entwickeln sich in den ErbB4 Nullmutanten nicht vollständig, wodurch der Blutfluss stark reduziert ist. Die Nullmutante zeigt zudem phänotypische Veränderungen im Stammhirn. Um die Analyse der ErbB4 Funktion in späteren Stadien zu ermöglichen, wurde ErbB4 in der Nullmutante unter Kontrolle eines Herz-spezifischen Myosin-Promotors exprimiert [Tidcombe et al. 2003]. Diese „*heart rescue*“ Nullmutanten überleben und sind fertil, bei tragenden Weibchen verläuft jedoch die Differenzierung der Milchdrüsen fehlerhaft, wodurch Beeinträchtigungen bei der Laktation auftreten. In diesen Mutanten wurde außerdem eine gestörte Entwicklung der

Kranialnerven sowie eine erhöhte Anzahl großer Interneuronen im Kleinhirn beobachtet [Tidcombe et al. 2003]. Inzwischen wurde auch eine konditionale ErbB4 Mausmutante hergestellt, die eine zell-spezifische Analyse der ErbB4 Funktion ermöglicht [Long et al. 2003]. Die Deletion des Rezeptors in neuronalen Vorläuferzellen führte zu einer veränderten Organisation und Migration von Neuroblasten im rostralen Migrationsstrom (RMS) [Anton et al. 2004]. In der „*heart rescue*“ Nullmutante wurde ebenfalls ein Migrationsdefekt von GABAergen Interneuronen beobachtet, die vom Subpallium in den Kortex wandern [Flames et al. 2004]. Zudem ist die axonale Wegfindung der thalamo-kortikalen Fasern in diesen Nullmutanten gestört [Lopez-Bendito et al. 2006]. ErbB4 scheint daher eine wichtige Rolle während der Entwicklung und vor allem bei der Migration von Interneuronen zu spielen. Über die Funktion von ErbB4 im adulten Gehirn ist bisher nur wenig bekannt.

### **3.7 Die Rolle des NRG1-ErbB4-Signalwegs bei der Regulation synaptischer Plastizität**

Der NRG1-ErbB4-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und Differenzierung neuraler Zellen während der Entwicklung [Buonanno and Fischbach 2001]. So wird die Migration von GABAergen Interneuronen aus dem Subpallium in den Kortex durch das Zusammenspiel verschiedener NRG1-Isoformen und ErbB4 reguliert [Flames et al. 2004]. Zudem sind juxtakrine und parakrine NRG1-Signale bei der axonalen Wegfindung der thalamo-kortikalen Fasern entscheidend [Lopez-Bendito et al. 2006]. Ebenso stimuliert die EGF- $\beta$ -Domäne von NRG1 in Hippokampus-Primärkulturen das Wachstum, die Länge und Verzweigungen von Neuriten [Gerecke et al. 2004]. Die Funktion des Signalwegs während der Entwicklung ist relativ gut untersucht, über die Rolle im adulten ZNS ist dagegen noch nicht viel bekannt. Eine aktuelle Studie zeigte jedoch, dass NRG1 keine maßgebliche Rolle bei der Myelinisierung des ZNS spielt [Brinkmann et al. 2008].

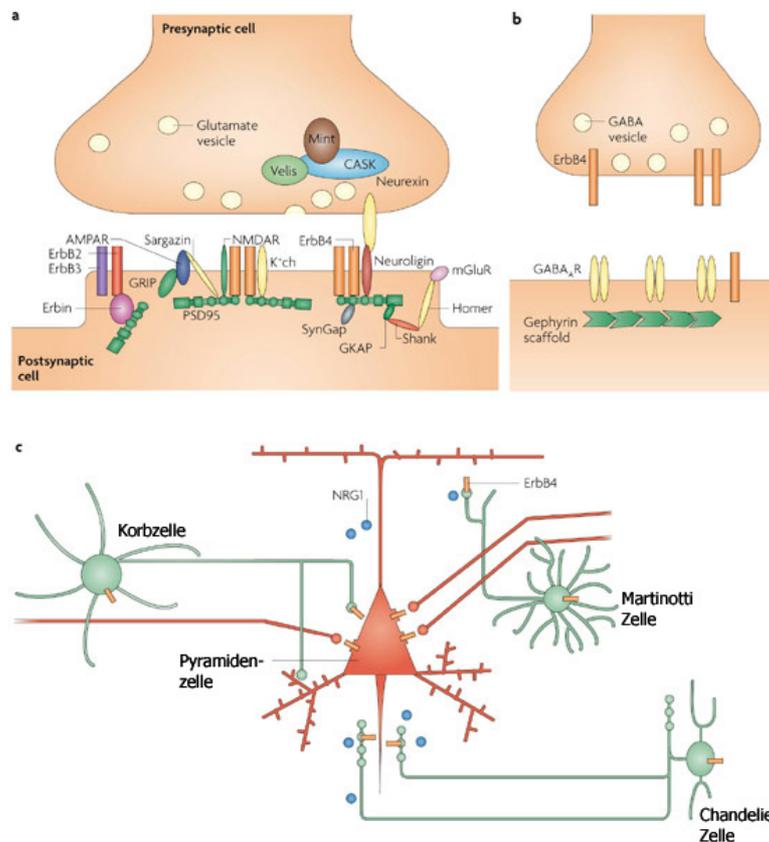
Verschiedene Zelltypen und Regionen des ZNS exprimieren NRG1 und ErbB4. NRG1 wurde u. a. in den Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippokampus nachgewiesen [Law et al. 2004; Okada and Corfas 2004]. Die Axone dieser Neurone bilden u. a. die Schaffer-Kollateralen, die die Nervenzellen der CA1-Region innervieren. Der ErbB4-Rezeptor kolokalisiert zusammen mit PSD95 in exzitatorischen Postsynapsen [Garcia et al. 2000; Huang et al. 2000]. Die Interaktion von ErbB4 mit PSD95 erhöht die Aktivierung des Rezeptors und der MAP-Kinase. Dabei wird die Bildung eines tenären Komplexes von zwei ErbB4 Molekülen mit PSD95 vermutet [Huang et al. 2000]. Die postulierte Lokalisation von NRG1 und ErbB4 deutet auf eine Rolle des Signalwegs in der Regulation synaptischer Plastizität hin (Abb.4). Verschiedene *in vitro* Studien zeigten bereits einen Einfluss des NRG1-ErbB-Signalwegs auf die Ausbildung der LTP (Langzeit-Potenzierung; *long term potentiation*) an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse [Huang et al. 2000; Ma et al. 2003;

Kwon et al. 2005]. Die Applikation der EGF- $\beta$ -Domäne von NRG1 führte in diesen Studien zu einer Reduktion der LTP. In Übereinstimmung mit diesen *in vitro* Daten konnte auch eine Verbesserung der LTP in der „*heart rescue*“ ErbB4 Nullmutante nachgewiesen werden [Pitcher et al. 2008]. Wie der NRG1-ErbB4-Signalweg die synaptische Transmission *in vivo* beeinflusst ist bislang unklar, *in vitro* Studien liefern jedoch einige Hinweise auf potentielle Mechanismen. So wurde in verschiedenen *in vitro* Studien ein Einfluss des NRG1-ErbB4-Signalwegs auf die Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren beobachtet. In kultivierten Pyramidenzellen des präfrontalen Kortex wurden nach Gabe von rekombinanten NRG1 reduzierte NMDA-Rezeptor-vermittelte exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSC; *excitatory postsynaptic currents*) detektiert [Gu et al. 2005]. Die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors wird hierbei vermutlich durch einen Aktin-abhängigen Mechanismus internalisiert. Außerdem wurde beobachtet, dass der NRG1-ErbB4-Signalweg über die Tyrosinkinase Fyn und Pyk2 (Prolin-reiche Tyrosin-Kinase) die Phosphorylierung eines Tyrosin-Restes (Y1472) der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors stimulieren kann [Bjarnadottir et al. 2007]. Im Gegensatz dazu wurde im Hippokampus nach der Applikation von rekombinantem NRG1 eine Reduktion der AMPA-Rezeptor-vermittelten EPSCs nachgewiesen [Kwon et al. 2005]. Vor kurzem wurde in organotypischen Hippokampusschnittkulturen gezeigt, dass die Transfektion von ErbB4 in CA1-Pyramidenzellen zu verstärkten AMPA-Rezeptor Strömen und vergrößerten dendritischen Spines führt [Li et al. 2007].

Ein Einfluss des NRG1-ErbB4-Signalwegs auf die synaptische Plastizität wurde aber auch für Interneurone beobachtet. Eine längerfristige Behandlung (2-4 d) mit der EGF-Domäne von NRG1 führte in hippokampalen Interneuronen zu einer erhöhten Anzahl der  $\alpha 7$ -Untereinheit des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors (nACh), während die kurzfristige Gabe (innerhalb weniger Minuten) von NRG1 eine Reduktion der  $\alpha 7$ nACh EPSCs verursachte [Liu et al. 2001; Chang and Fischbach 2006]. Zudem konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass NRG1 aktivitäts-abhängig die GABA Freisetzung in Gehirnschnitten vom präfrontalen Kortex erhöht [Woo et al. 2007]. In unstimulierten Präparationen oder bei spontanen inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSC; *inhibitory postsynaptic currents*) wurde keine Veränderung beobachtet. Das NRG1-Signal wird hierbei von ErbB4-Rezeptoren weitergeleitet, die vermutlich in der inhibitorischen Präsynapse lokalisiert sind [Woo et al. 2007] (Abb.4).

Insgesamt liefert die aktuelle Literatur eine Vielzahl von Hinweisen auf mögliche Einflüsse des NRG1-ErbB4-Signalwegs auf die synaptische Transmission und Plastizität. Dabei reguliert der Signalweg möglicherweise Interaktionen zwischen Pyramidenzellen, sowie zwischen Pyramidenzellen und Interneuronen (Abb.4). Dabei wird ErbB4 in der Postsynapse von Pyramidenzellen sowie in der Prä- und Postsynapse von Interneuronen vermutet [Mei and Xiong 2008]. Gerade die Expression in Pyramidenzellen wird jedoch kontrovers diskutiert [Yau et al. 2003; Fox and Kornblum 2005]. Die Relevanz dieser Studien für die *in*

*in vivo* Funktion des Signalwegs bleibt jedoch ungewiss. So wurde NRG1 typ I ursprünglich als präsynaptisches Membranprotein von Motorneuronen beschrieben, das für die Expression von ACh-Rezeptoren in der neuromuskulären Synapse (NMJ; *neuromuscular junction*) entscheidend ist [Falls et al. 1993; Buonanno and Fischbach 2001]. *In vivo* Studien mit konditionalen ErbB2/ErbB4 Nullmutanten zeigten aber, dass der NRG1-ErbB-Signalweg für die Entwicklung der NMJ nicht benötigt wird [Escher et al. 2005; Jaworski and Burden 2006]. Die Analyse von zelltyp-spezifischen Mausmutanten könnte in Zukunft für ein besseres Verständnis der *in vivo* Funktion des Signalwegs bei der synaptischen Plastizität sorgen.



**Abb.4 NRG1-ErbB4-Signalweg reguliert die synaptische Plastizität**

(a) ErbB4 bindet an PSD95 in der Postsynapse exzitatorischer Synapsen. Durch die Interaktion mit PSD95 beeinflusst der Rezeptor wahrscheinlich die Aktivität und Lokalisation von Neurotransmitter-Rezeptoren, wie z.B. NMDA- und AMPA-Rezeptoren. (b) ErbB4 liegt möglicherweise ebenso in der Prä- und Postsynapse inhibitorischer Synapsen vor. (c) Die Aktivität von Pyramidenzellen (rot) wird durch exzitatorische glutamaterge Neurone und zahlreiche GABAerge Interneurone (grün) reguliert, z.B. von Korbzellen, „Martinotti“-Zellen und „Chandelier“-Zellen. Der NRG1-ErbB4-Signalweg möglicherweise spielt bei der Regulation der synaptischen Transmission an verschiedenen Pyramidenzell-Interneuron-Synapsen eine Rolle (verändert nach Mei und Xiong, 08).

### 3.8 Schizophrenie und der NRG1-ErbB4-Signalweg

0,5-1% der Bevölkerung entwickeln im Laufe ihres Lebens Schizophrenie. Diese genetisch komplexe neurologische Erkrankung zeichnet sich durch psychische und kognitive Beeinträchtigungen aus, die in positive (Wahnvorstellungen, Halluzinationen) und negative Symptome (kognitive Defizite, soziale Isolation, Aufmerksamkeitsstörungen) eingeteilt werden. Die genauen Ursachen, die zu Schizophrenie führen sind unbekannt. Multiple genetische Faktoren und Umwelteinflüsse spielen eine Rolle bei der Auslösung der Krankheit. So zeigten Zwillingsstudien, dass Geschwister eines Schizophrenie-Patienten mit einer Wahrscheinlichkeit von ~50% ebenfalls Schizophrenie ausbilden [Cardno and Gottesman 2000]. Verschiedene Theorien wurden entwickelt, um die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Krankheit zu erklären. Schizophrenie wird zum Teil als neurodegenerative Krankheit betrachtet, andere Modelle gehen jedoch von einer relativ spät-einsetzenden neurologischen Entwicklungsstörung aus, die dopaminerge, glutamaterge und GABAerge Netzwerke betrifft [Harrison and Weinberger 2005; Lang et al. 2007].

Bei der Suche nach genetischen Risikofaktoren wurden Varianten des NRG1-Gens in einer Isländischen Bevölkerungsgruppe als potentielle Risikofaktoren entdeckt [Stefansson et al. 2002]. In einigen (aber nicht allen) der darauffolgenden Studien konnte in anderen Bevölkerungsgruppen erneut eine Verbindung zwischen Varianten des NRG1-Gens und Schizophrenie hergestellt werden [Harrison and Weinberger 2005]. Keiner der bisher bekannten Haplotypen korreliert mit der kodierenden Sequenz des NRG1-Gens. Daher tragen vermutlich eher Veränderungen im Expressionsniveau von NRG1 als eine veränderte Proteinfunktion zur Krankheit bei. In verschiedenen Studien wurde auch eine Verbindung zwischen dem ErbB4-Gen und Schizophrenie beobachtet [Nicodemus et al. 2006; Silberberg et al. 2006; Law et al. 2007]. So wurde post mortem eine erhöhte Expression der ErbB4-Isoformen JMa und CYT1 im dorso-lateralen präfrontalen Kortex von an Schizophrenie erkrankten Patienten detektiert [Silberberg et al. 2006; Law et al. 2007]. Eine weitere Studie zeigte außerdem eine deutliche Steigerung der NRG1-induzierbaren ErbB4-Aktivität in post mortem-Gewebe von Schizophrenie-Patienten [Hahn et al. 2006]. Möglicherweise spielen also auch Veränderungen bei der Expression und Aktivität von ErbB4 eine Rolle bei der Entstehung von Schizophrenie.

Eine Reihe von Studien deuten auf eine Funktion von NRG1 und ErbB4 bei neuronalen Entwicklungsprozessen hin (Migration, Differenzierung, synaptische Plastizität), die eventuell auch bei Schizophrenie-Patienten betroffen sind [Corfas et al. 2004; Stefansson et al. 2004]. Bezüglich der Rolle des Signalwegs bei der Krankheitsentstehung erweckt gerade die vermutete Funktion bei der Regulation der Neurotransmission Interesse, nachdem eine Myelinisierungsstörung durch leicht veränderte NRG1-Expression unwahrscheinlich ist [Brinkmann et al. 2008]. So wurde in Patienten mit Schizophrenie in verschiedenen Gehirnregionen verringerte Mengen von NMDA-Rezeptoren detektiert [Carlsson and

Carlsson 1990; Akbarian et al. 1996]. Entsprechend konnten in Mausmutanten mit reduzierter NRG1-Expression 16% weniger funktionsfähige NMDA-Rezeptoren nachgewiesen werden [Stefansson et al. 2002]. Darüberhinaus wurde eine Hypophosphorylierung der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in Mausmutanten mit reduzierter NRG1- bzw. ErbB4-Expression beobachtet [Bjarnadottir et al. 2007]. In diesem Fall führte die Gabe von Clozapin, eines atypischen Antipsychotikums, zu einer verstärkten Phosphorylierung der Untereinheit, so dass in den Mausmutanten ein normales Niveau erreicht wurde.

Die Daten von Verhaltensstudien mit NRG1- bzw. ErbB4-Mausmutanten deuten ebenfalls auf eine Rolle des Signalwegs bei der Entwicklung von Schizophrenie hin. So zeigten Mäuse mit reduzierter NRG1- bzw. ErbB4-Expression Verhaltensauffälligkeiten, die Gemeinsamkeiten mit pharmakologisch induzierten „Mausmodellen“ für Schizophrenie aufweisen, z.B. Hyperaktivität sowie Defizite bei der PPI (Präpuls Inhibition; *prepulse inhibition*) [Stefansson et al. 2002; Boucher et al. 2007; Karl et al. 2007; O'Tuathaigh et al. 2007; Babovic et al. 2008; O'Tuathaigh et al. 2008]. Die PPI gilt als Maß für die sensorische Reaktionsunterdrückung. PPI-Prozesse blenden störende oder irrelevante Reize aus und verhindern damit eine Überlastung der Informationsverarbeitungssysteme. Es wird angenommen, dass eine Reihe kognitiver Störungen schizophrener Erkrankter eine unzureichende Funktionalität solcher PPI-Prozesse zugrunde liegt. Welche Rolle NRG1 und ErbB4 bei der Ätiologie oder der Behandlung von Schizophrenie spielen könnten ist bislang unklar. In Zukunft sind weitere Studien nötig, um die Bedeutung der veränderten NRG1- und ErbB4-Expression und der Aktivierung nachfolgender Signalwegen besser zu verstehen.

### 3.9 Zielsetzung der Arbeit

Veränderungen in der Aktivität des NRG1-ErbB4-Signalwegs im Gehirn stellen möglicherweise einen Risikofaktor bei der Entstehung von Schizophrenie dar. Die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen sind aber noch unbekannt. So ist insbesondere unklar, ob eine Verstärkung oder Abschwächung des Signalwegs zur Krankheitsentstehung beiträgt und welche Prozesse im Gehirn davon besonders betroffen sind. Eine wichtige Voraussetzung zur Beantwortung dieser Fragen ist ein besseres Verständnis der Expression und Funktion von ErbB4, des maßgeblichen neuronalen NRG1-Rezeptors im Gehirn.

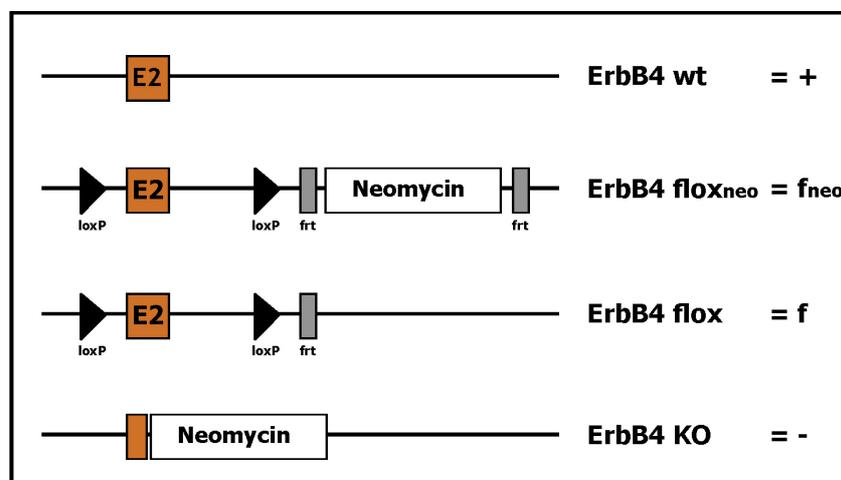
Einige *in vitro*-Studien deuten auf eine wichtige Rolle des NRG1-ErbB4-Signalwegs bei der Regulation synaptischer Transmission und Plastizität hin. Die ErbB4-Funktion im adulten Gehirn ist jedoch noch nicht genau bekannt, da Nullmutanten des ErbB4-Gens bereits während der Embryonalentwicklung sterben. Ausserdem wird das genaue Expressionsmuster von ErbB4 im Gehirn kontrovers diskutiert.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, zu einem besseren Verständnis der ErbB4-Expression im adulten Gehirn von Mäusen beizutragen. Mit Hilfe einer Koexpressionsanalyse sollten die kortikalen Zelltypen bestimmt werden, die ErbB4 exprimieren. Daneben sollte mit einer Einzelzell-RT-PCR eingehender analysiert werden, welche ErbB4-Isoformen im adulten Gehirn vorliegen.

Mit Hilfe konditionaler, zelltyp-spezifischer ErbB4-Nullmutanten sollte die *in vivo*-Funktion des NRG1-ErbB4-Signalwegs in kortikalen Pyramidenzellen und Interneuronen des adulten Gehirns genauer untersucht werden. Insbesondere sollte die Rolle von ErbB4 bei der Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren und der Modulation synaptischer Plastizität bestimmt werden. Ein besseres Verständnis der ErbB4-Funktion auf molekularer und zellulärer Ebene stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um die zugrundeliegenden Pathomechanismen bei der Entstehung von Schizophrenie besser zu verstehen.

## 4 ERGEBNISSE

Der ErbB4-Rezeptor weist eine prominente Expression während der Entwicklung auf und wird im adulten Gehirn weiterhin jedoch leicht abgeschwächt im Kortex und Hippokampus exprimiert. Die Funktion von ErbB4 während der Entwicklung und bei der Migration von Interneuronen ist relativ gut untersucht [Anton et al. 2004; Flames et al. 2004]. Dagegen ist bisher noch sehr wenig über die *in vivo*-Funktion des Rezeptors im adulten Gehirn bekannt. Konditionale Mausmutanten bieten eine ideale Möglichkeit, um die postnatale Funktion des Rezeptors in verschiedenen Zelltypen zu untersuchen. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine konditionale ErbB4 Mausmutante ( $ErbB4^{fneo/fneo}$ ) verwendet [Long et al. 2003], bei der das zweite Exon des ErbB4-Gens von zwei loxP Sequenzen flankiert wird (Abb.5). Zur Zelltyp-spezifischen Inaktivierung von ErbB4 wurden verschiedene transgene Mauslinien eingesetzt, die die Cre-Rekombinase erst postnatal exprimieren. Der Verlust von Exon 2 führt zu einer Verschiebung des Leserasters im ErbB4-Gen, wodurch nach 176 bp ein Stoppcodon entsteht. Bei der Translation der mutierten RNA entsteht ein 59 Aminosäuren langes Peptid, das nur in den ersten 29 Aminosäuren mit ErbB4 übereinstimmt.



**Abb.5 ErbB4-Mausmutanten**

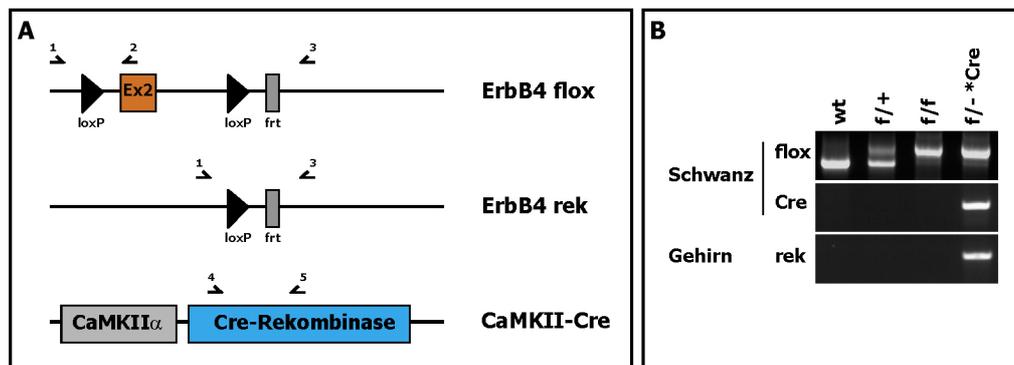
Schematische Darstellung des modifizierten ErbB4-Locus im Bereich von Exon 2 im Vergleich zum Wildtyp (wt) Allel. Die in der ursprünglichen konditionalen ErbB4 Mutante ( $ErbB4^{fneo/fneo}$ ) vorhandene Neomycin-Kassette wurde durch das Einkreuzen einer transgenen Mausmutante entfernt, die die Flp-Rekombinase ubiquitär exprimiert. Für die Analysen wurde die modifizierte ErbB4 Mutante ( $ErbB4^{ff}$ ) verwendet. In der ErbB4 Nullmutante ( $ErbB4^{-/-}$ ) sind Teile des Exon 2 durch eine Neomycin-Kassette ersetzt (Gassmann et al., 95). E2: Exon2; KO: *knock out*; wt: Wildtyp

Die ursprüngliche konditionale ErbB4 Mausmutante enthält zusätzlich noch eine von zwei frt Sequenzen flankierte Neomycin-Kassette als Selektionsmarker (Abb.5). Derartige Selektionsmarker können die Expression von in der Nähe lokalisierten Genen beeinflussen,

wodurch die Interpretation des Phänotyps von Mausmutanten erschwert werden kann [Fiering et al. 1995]. Aus diesem Grund wurde durch das Einkreuzen einer transgenen Mauslinie, die die Flip-Rekombinase ubiquitär exprimiert, die Neomycin-Kassette in der ErbB4 Mausmutante entfernt (Abb.5). Diese modifizierte konditionale ErbB4 Mutante (ErbB4<sup>ff</sup>) wurde verwendet, um die Funktion des Rezeptors in Pyramidenzellen und Interneuronen zu untersuchen.

#### 4.1 Herstellung einer Pyramidenzell-spezifischer ErbB4 Mausmutante

Zu Beginn dieser Arbeit deuteten eine Reihe von Studien auf eine Funktion des ErbB4-Rezeptors bei der synaptischen Plastizität in Pyramidenzellen hin [Ozaki et al. 1997; Rieff et al. 1999; Huang et al. 2000]. Deshalb wurde zuerst eine Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) erzeugt. Die konditionale ErbB4 Mausmutante wurde dafür mit einer Mauslinie (CaMKII-Cre) gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter dem  $\alpha$  CaMKII Promotor exprimiert [Minichiello et al. 1999]. Dadurch wird in allen Cre-Rekombinase exprimierenden Pyramidenzellen ErbB4 ausgeschaltet. Außerdem wurde anfänglich auch die klassische ErbB4 Nullmutante mit eingekreuzt [Gassmann et al. 1995]. Die zusätzliche Reduktion von ErbB4 in allen Zellen kann hierbei zu einer Verstärkung des Phänotyps führen.



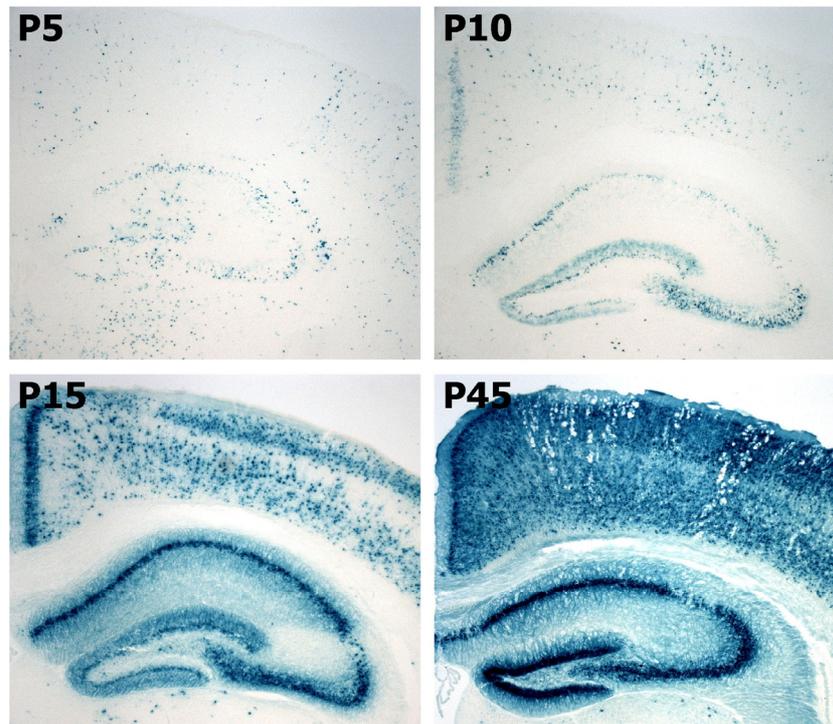
**Abb.6 Rekombinationsnachweis in der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante**

(A) Schematische Darstellung des geflochtenen ErbB4-Locus vor und nach Rekombination sowie des verwendeten CaMKII-Cre Transgens. Die für die PCR-Analyse (s. B) verwendeten Primer sind eingezeichnet. (B) PCR auf genomische DNA von Schwanzbiopsiematerial und Gehirngewebe. Oben: Primer 1 und 2 amplifizieren ein 360 bp großes Produkt vom wt-Allel und ein 500 bp großes Produkt vom geflochtenen ErbB4-Allel. In heterozygoten ErbB4 Mutanten (ErbB4<sup>f/+</sup>) werden beide Produkte erzeugt. Die Primer amplifizieren kein Produkt im „knock-out“ Allel. Mitte: Nachweis des Cre-Rekombinase-Transgens (Cre (550 bp): Primer 4, 5). Unten: Die Rekombination wurde nur im Gehirn von ErbB4 Mausmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) mit den Primern 1 und 3 nachgewiesen, die eine 600 bp Bande nach der Deletion des Exon 2 erzeugen. Primer: 1 = 5893; 2 = 6369; 3 = 9134; 4 = 5383; 5 = 5382; rek: rekombiniert

Um die Deletion von Exon 2 zu überprüfen, wurde eine PCR-Analyse auf genomischer DNA von Schwanzbiopsiematerial und Gehirngewebe von Mäusen mit verschiedenen Genotypen durchgeführt (Abb.6). Die DNA vom Gehirngewebe diente dem Nachweis der Rekombination. Die dabei verwendeten Primer 5893 und 9134 können erst durch die Deletion von Exon 2 eine ca. 600 bp große Bande erzeugen. Im wt Locus und im geflochtenen ErbB4-Allel liegen sie dagegen 2,5 kb bzw. 2,9 kb auseinander. Die Rekombination im Gehirn konnte wie erwartet nur in den Mäusen nachgewiesen werden, die sowohl das geflochte ErbB4-Allel als auch das Cre-Rekombinase Transgen enthielten.

#### **4.2 Bestimmung des Cre-Rekombinase vermittelten Rekombinationsmusters der CaMKII-Cre Mauslinie**

Zur Bestimmung des Expressionsmusters und des Zeitpunktes, an dem die Cre-Expression der CaMKII-Cre Mauslinie einsetzt, wurde diese mit einer Reporter-Mauslinie (ROSA26-stop-LacZ) verpaart. Die Reporter-Mauslinie enthält unter der Kontrolle eines in allen Zellen aktiven ROSA-Promotors eine geflochte Stoppkassette, gefolgt von einer  $\beta$ -Galaktosidase-cDNA. Die von der Cre-Rekombinase vermittelte Deletion der Stoppkassette ermöglicht die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase. Der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität erfolgte durch eine Farbreaktion, bei der das Enzym das künstliche Substrat X-Gal zu 5-Brom-4-Chlorindol umsetzt. Das Produkt wird anschließend zu einem blauen Indigo-Komplex weiter oxidiert. Von Gehirnen doppeltransgener Mäuse wurden im Alter von Postnataltag (P) 5, P10, P15 und P45 frontale Kryostatschnitte hergestellt und eine X-Gal Histochemie durchgeführt. Bereits bei P5 wurden vereinzelt blau gefärbte Zellen im Kortex und Hippokampus detektiert (Abb.7). Auch im Kortex von 10 Tage alten Mäusen exprimieren nur einzelne Zellen die Cre-Rekombinase, dagegen sind zu diesem Zeitpunkt im Hippokampus bereits viele Zellen rekombiniert, vor allem in der CA3-Region. Bei P15 scheinen im Hippokampus nahezu alle Neurone rekombiniert, wohingegen im Kortex die Expression mit zunehmendem Alter noch etwas zunimmt. Die Expression der Cre-Rekombinase beginnt somit spät genug, um die postnatale ErbB4-Funktion in Pyramidenzellen zu untersuchen.

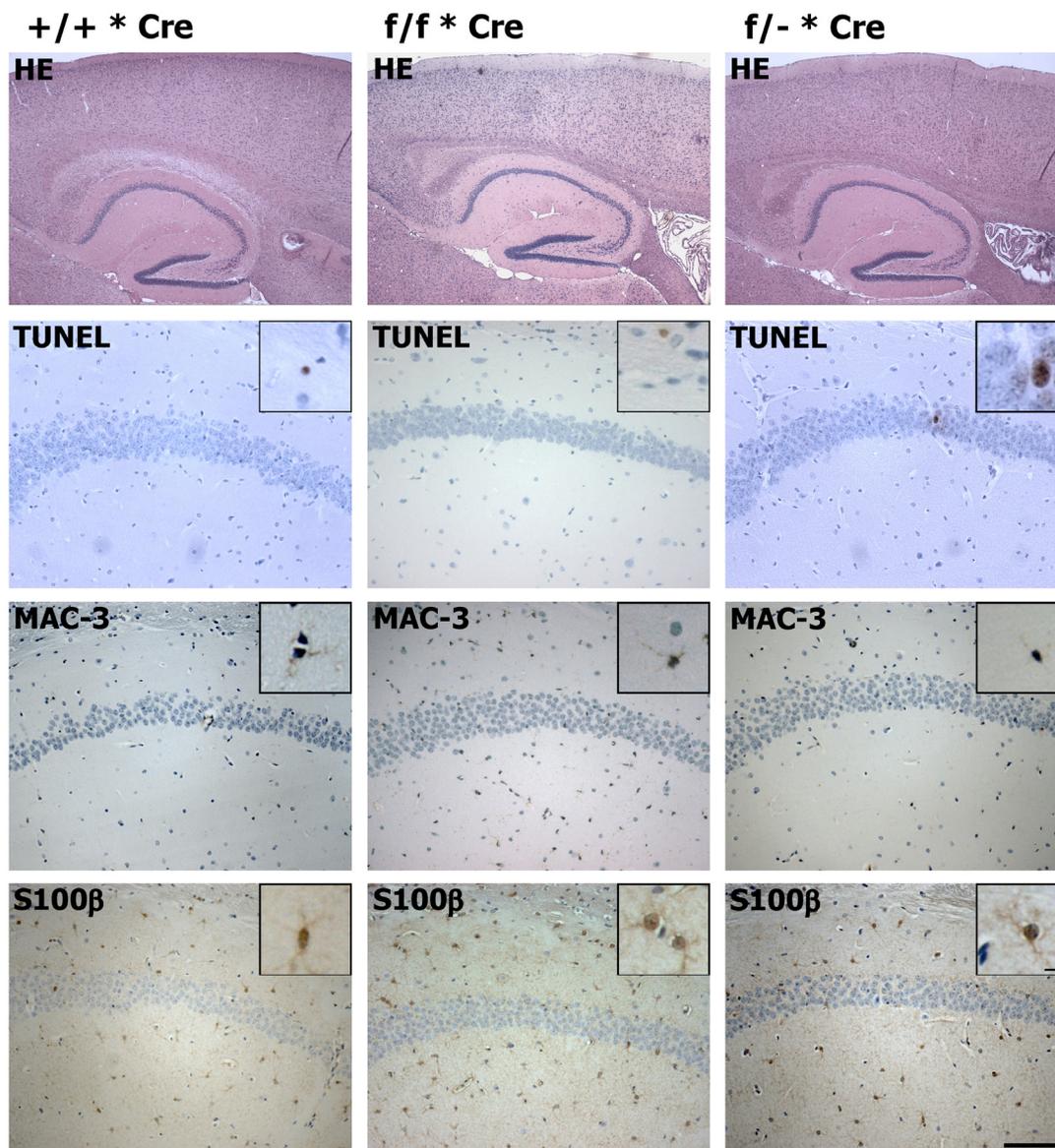


#### Abb.7 Expression der Cre-Rekombinase in der CaMKII-Cre Mauslinie

Zur Analyse der Cre-Rekombinase-Expression wurde die CaMKII-Cre Mauslinie mit einer Reporter-Mauslinie (ROSA26-stop-LacZ) verpaart. Auf 20  $\mu\text{m}$  dicken, frontalen Kryostatschnitten von doppeltransgenen Mäusen im Alter von P5, P10, P15 und P45 wurde eine X-Gal-Histochemie durchgeführt. Blaue Färbung markiert die Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination des Reporters. Die Cre-Rekombinase-Expression beginnt in einzelnen Zellen bei P5. Bei P10 sind einzelne Zellen im Kortex und zahlreiche Zellen in der CA3-Region des Hippokampus rekombiniert. Bei P15 sind nahezu alle Neurone im Hippokampus rekombiniert. Die Anzahl Cre-Rekombinase-exprimierender Zellen nimmt im Kortex mit zunehmendem Alter noch etwas zu (P45).

### 4.3 Charakterisierung der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mausmutante

Die Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Mausmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>fl/fl</sup>) zeigte keine sofort ersichtlichen phänotypischen Veränderungen. Die Geburtenrate und Wurfgröße entsprach wildtypischen Vergleichswerten und die Verteilung der Genotypen folgte Mendel. Mutante Tiere wiesen eine normale, alters- und geschlechtsabhängige Gewichtszunahme sowie eine unveränderte durchschnittliche Lebenserwartung auf. Bei männlichen Tieren, die sowohl das gefloxtete ErbB4-Allel als auch das Cre-Rekombinase Transgen tragen, kann es zu einer Keimbahnrekombination kommen (U. Fünfschilling, nicht veröffentlichte Daten). Daher wurden in der Zucht ausschließlich weibliche doppeltransgene Tiere eingesetzt, die das gefloxtete ErbB4-Allel und das Cre-Rekombinase Transgen tragen.



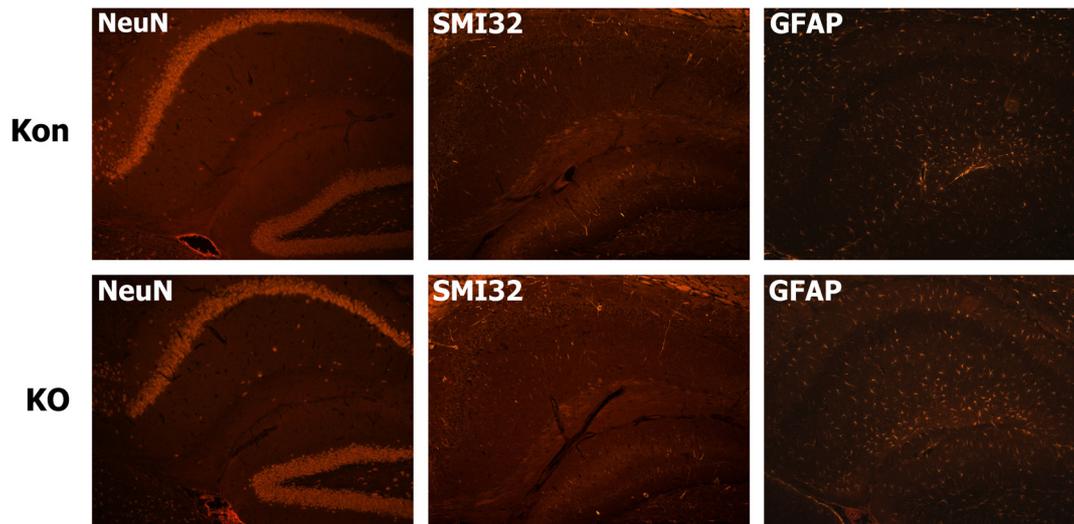
### Abb.8 Immunhistochemische Analyse 2 Monate alter Pyramidenzell-spezifischer ErbB4 Nullmutanten

Morphologische und histologische Analysen mit verschiedenen Markern auf 5 µm dicken, sagittalen Paraffinschnitten von 2 Monate alten Mausmutanten. Die Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutante ( $f/f^*Cre$ ) sowie ErbB4 Nullmutanten mit einem zusätzlichen ErbB4 „*knock-out*“ Allel ( $f/-^*Cre$ ) wurden mit Tiere der CaMKII-Cre Mauslinie ( $+/+^*Cre$ ) verglichen ( $n = 3$ ). Die HE-Färbung zeigte keine morphologischen Unterschiede im Kortex und Hippokampus. Bei den Immunfärbungen und der TUNEL-Analyse ist die CA1-Region des Hippokampus dargestellt (Maßstabsbalken entspricht 100 µm, gültig für alle CA1-Ausschnitte). Mit der TUNEL-Analyse wurden nur vereinzelt apoptotische Zellen detektiert (siehe Vergrößerung). Es wurde keine Mikroglia-Aktivierung mit der MAC3-Immunfärbung beobachtet, nur einzelne Zellen waren gefärbt (siehe Vergrößerung). Die Anzahl an S100β positiven Astrozyten war unverändert (siehe Vergrößerung; Maßstabsbalken entspricht 10 µm, gültig für alle Vergrößerungen).

### 4.3.1 Histologische Analysen zeigen keine ersichtlichen Veränderungen

Zur genaueren immunhistologischen Analyse der Kortex- und Hippokampus-Morphologie wurden sagittale Paraffinschnitte von ErbB4 Mausmutanten und Kontrollen bei zwei verschiedenen Altersstadien verwendet. Im Alter von 2 Monaten wurden neben den Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mausmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) mit homozygot gefloxtem ErbB4-Allel zusätzlich ErbB4 Mausmutanten untersucht, die ein gefloxtes und ein ErbB4 „knock-out“ Allel enthielten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff/-</sup>). Dadurch enthalten diese Tiere zusätzlich zur postnatalen Rekombination in Pyramidenzellen in allen Zellen ein Nullallel des ErbB4-Gens. Diese verstärkte Reduktion könnte zu einem ausgeprägteren Phänotyp führen. Als Kontrollen wurden Mäuse verwendet, die nur das Cre-Rekombinase Transgen unter Kontrolle des  $\alpha$  CaMKII Promotors enthielten. Pro Genotyp wurden dabei jeweils drei Tiere analysiert.

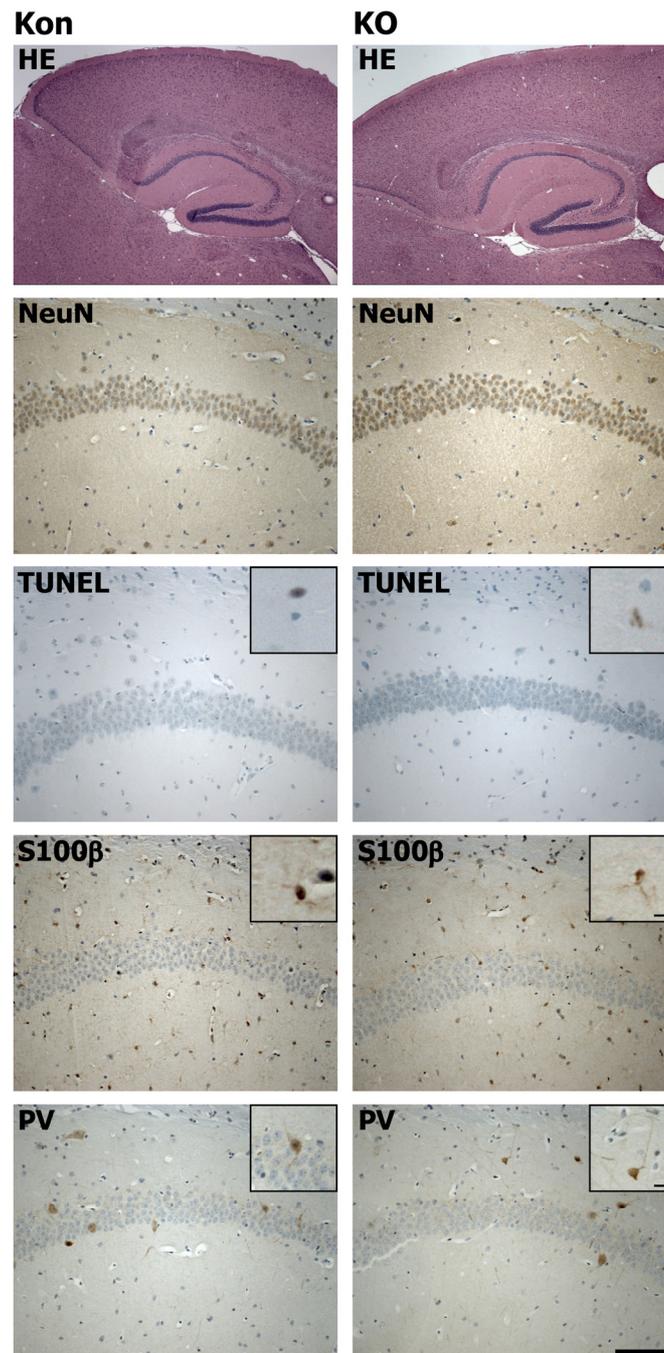
Eventuell vorhandene morphologische Unterschiede sollten zuerst mit einer HE-Färbung sichtbar gemacht werden, ErbB4 Nullmutanten und Kontrollen waren jedoch nicht unterscheidbar (Abb.8). Auch bei weiteren immunhistologischen Analysen konnten keine Auffälligkeiten entdeckt werden (Abb.8). Durch die TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) wurde untersucht, ob die postnatale Deletion von ErbB4 in Pyramidenzellen im Kortex oder Hippokampus zu erhöhter Apoptose führt. Dies war bei den 2 Monate alten Tieren nicht der Fall (Abb.8). Als ein Marker für neurodegenerative Veränderungen wurde APP (*Amyloid-Precursor-Protein*) verwendet. APP kann proteolytisch zu Amyloid  $\beta$  prozessiert werden, das einen Hauptbestandteil der Plaques in Gehirnen von Alzheimer Patienten darstellt [Ling et al. 2003; Zheng and Koo 2006]. Mit Hilfe einer MAC-3-Immunhistochemie wurde zudem die Aktivierung von Mikroglia untersucht. Diese Immunabwehrreaktion wird durch neuronale oder synaptische Degeneration im ZNS hervorgerufen und dient u. a. der Beseitigung von Zelltrümmern [Gehrmann et al. 1995]. Die Expression beider Proteine war unverändert (Abb.8, Daten nicht gezeigt). Als Marker für Astrozyten wurde das Kalzium-bindende Protein S100 $\beta$  und das zytosolische Intermediärfilament GFAP (*Glial-fibrillary-acidic-protein*) verwendet. Bei beiden Markern konnte keine Veränderung bezüglich der Expression festgestellt werden (Abb.8 und Abb.9). Die Darstellung von neuronalen Zellkernen mit einer NeuN-Immunfärbung zeigte wie die immunhistologische Analyse von SMI32, einem speziell in Neuronen vorkommenden nicht-phosphorylierten Neurofilament, keine ersichtlichen Veränderungen (Abb.9). Somit konnte in 2 Monate alten ErbB4 Mutanten weder vermehrter programmierter Zelltod, Neurodegeneration, Mikroglia-Aktivierung, Astrozytose oder generelle Veränderungen der Neuronen festgestellt werden.



**Abb.9 Analyse der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante mittels fluoreszenter Immunhistochemie**

Fluoreszente immunhistochemische Analysen mit verschiedenen Markern auf 5  $\mu\text{m}$  dicken, sagittalen Paraffinschnitten von 2 Monate alten Mausmutanten. Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutanten mit einem zusätzlichen ErbB4 „knock-out“ Allel (KO) wurden mit CaMKII-Cre-Kontrolltieren (Kon) verglichen ( $n = 3$ ). Ausschnitte vom Hippokampus sind dargestellt. Es wurden keine neuronalen Veränderungen bei der NeuN- und SMI32-Immunfärbung beobachtet. Die GFAP-Immunfärbung zeigte keine Astrogliose. KO: CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>fl/-</sup>; Kon: CaMKII-Cre

Die relativ späte, postnatale Deletion von ErbB4 und die Befunde in 2 Monate alten Tieren legten nahe, dass der Verlust der ErbB4-Funktion möglicherweise erst in späteren Stadien zu histologischen Veränderungen führt. Daher wurden die immunhistologischen Untersuchungen mit sagittalen Paraffinschnitten bei 6 Monate alten ErbB4 Mausmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>fl/fl</sup>) und Kontrollen wiederholt. Dabei wurden Mäuse mit homozygot gefloxtem ErbB4-Allel (ErbB4<sup>fl/fl</sup>) als Kontrollen verwendet. Die Analyse erfolgte erneut mit drei Tieren pro Genotyp, wobei alle Mäuse aus einem Wurf stammten. Wie in Abbildung 10 gezeigt, gab es auch im Alter von 6 Monaten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mutanten und Kontrollen. Die HE-Färbung war ebenso wie die chromogene NeuN-Immunfärbung unauffällig. Auch im fortgeschrittenen Alter wurde mit Hilfe der TUNEL-Methode keine erhöhte Apoptose nachgewiesen (Abb.10). Mit der APP- und der S100 $\beta$ -IHC konnten ebenfalls keine Unterschiede aufgezeigt werden (Abb.10, Daten nicht gezeigt). GABAerge Interneurone sind im Kortex und Hippokampus von „heart rescue“ Nullmutanten signifikant reduziert [Flames et al. 2004]. Daher wurden zusätzlich Parvalbumin (PV) positive Interneurone histologisch untersucht. Allerdings wurden hier ebenfalls keine Veränderungen beobachtet (Abb.10). Somit konnten auch im Alter von 6 Monaten keine histologischen Unterschiede zwischen der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>fl/fl</sup>) und den Kontrollen festgestellt werden.

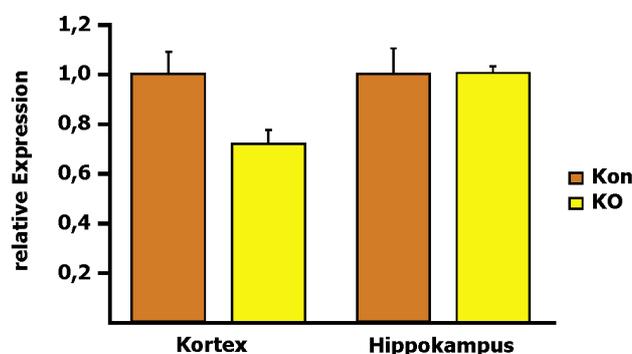


**Abb.10 Immunhistochemische Analyse 6 Monate alter Pyramidenzell-spezifischer ErbB4 Nullmutanten**

Morphologische und histologische Analysen mit verschiedenen Markern auf 5 µm dicken, sagittalen Paraffinschnitten von 6 Monate alten Mausmutanten. Die Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Mutanten (Kon) verglichen (n = 3). Die HE-Färbung zeigte keine morphologischen Unterschiede im Kortex und Hippokampus. Bei den Immunfärbungen und der TUNEL-Analyse ist die CA1-Region des Hippokampus dargestellt (Maßstabsbalken entspricht 100 µm, gültig für alle CA1-Ausschnitte). Die NeuN-Immunfärbung zeigte keine neuronalen Veränderungen. Mit der TUNEL-Analyse wurden nur vereinzelt apoptotische Zellen detektiert (siehe Vergrößerung). Die Anzahl an S100β positiven Astrozyten war unverändert (siehe Vergrößerung; Maßstabsbalken entspricht 10 µm, gültig für TUNEL und S100β Vergrößerungen) Ebenso wurde bei der PV-Immunfärbung keine Veränderungen bezüglich der Verteilung und Anzahl der Interneurone beobachtet (siehe Vergrößerung; Maßstabsbalken entspricht 20 µm). KO: CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>

### 4.3.2 Geringe Reduktion der ErbB4-Expression in der Pyramidenzell-spezifischen Nullmutante

Die ErbB4-Expression in Pyramidenzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Gerecke et al. 2001; Yau et al. 2003]. Verschiedene *in vitro* Studien zeigten jedoch einen Einfluss des Signalweges in pyramidalen Neuronen [Ozaki et al. 1997; Rieff et al. 1999]. Daher wurde untersucht, ob in der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) eine Reduktion der ErbB4-Expression vorlag. Da die Deletion von ErbB4 durch wechselseitige Regulationsmechanismen zu einer veränderten Expression der anderen ErbB-Rezeptoren oder des Liganden Neuregulin 1 (NRG1) führen könnte, wurde deren Expression mit Hilfe einer quantitativen *real time* PCR (qRT-PCR) untersucht.



**Abb.11 Geringe Reduktion der ErbB4-Expression in der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante**

Quantitative *real time* PCR-Analyse mit cDNA aus Kortex- und Hippokampus-Gewebe von 3 Monate alten Mäusen. Die Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Mutanten (Kon) verglichen. Für die Analyse wurde jeweils die cDNA von sechs Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutanten bzw. von drei Kontrolltieren zusammengefasst. Eine leichte Reduktion der ErbB4 Expression wurde nur im Kortex der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutanten nachgewiesen. Die verwendeten Primer (11383, 11385) liegen in Exon 2 und Exon 3 des ErbB4-Gens. Fehlerbalken: Standardfehler; KO: CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>

Dafür wurde die RNA von 3 Monate alten Tieren aus Kortex- und Hippokampus-Gewebe präpariert. Insgesamt wurden sechs ErbB4 Nullmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) und drei konditionale ErbB4 Kontrolltiere (ErbB4<sup>ff</sup>) untersucht. Es wurde jeweils 1 µg RNA von Tieren mit dem gleichem Genotyp zusammengefasst und von dieser Mischung insgesamt 1 µg RNA für die cDNA-Synthese verwendet. So wurden nicht einzelne Tiere miteinander verglichen, sondern zwei Gruppen von Nullmutanten und Kontrollen. Dadurch kann die Expression einer Reihe von Genen untersucht werden und eine genauere Analyse auffälliger Gene anschließend mit der cDNA einzelner Tiere wiederholt werden. Die Normalisierung der relativen RNA Mengen der untersuchten Gene erfolgte dabei mit Hilfe von den drei Haushaltsgenen ATP5b, β-Actin und 18S RNA. Interessanterweise konnte im Hippokampus

der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) keine Reduktion der ErbB4-Expression nachgewiesen werden. Im Kortex schien der Rezeptor leicht reduziert zu sein (Abb.11). Die verwendeten Primer liegen in Exon 2 und Exon 3 des ErbB4-Gens, so dass durch die Deletion von Exon 2 in den Pyramidenzellen der Nullmutante keine ErbB4-cDNA mehr amplifiziert werden kann. Als Negativkontrolle diente cDNA aus dem Kortex von „*heart rescue*“ Nullmutanten, in der mit den entsprechenden Primern keine ErbB4-cDNA nachgewiesen werden konnte. Auch für ErbB2, ErbB3 und NRG1 konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante und der Kontrolle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Daten deuten darauf hin, dass der Rezeptor nur in wenigen Pyramidenzellen postnatal exprimiert wird. Zelltyp-spezifische Expressionsanalysen erfolgten im Rahmen der Einzelzell-RT-PCR (s. 4.4.2).

### 4.3.3 Unveränderte Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren

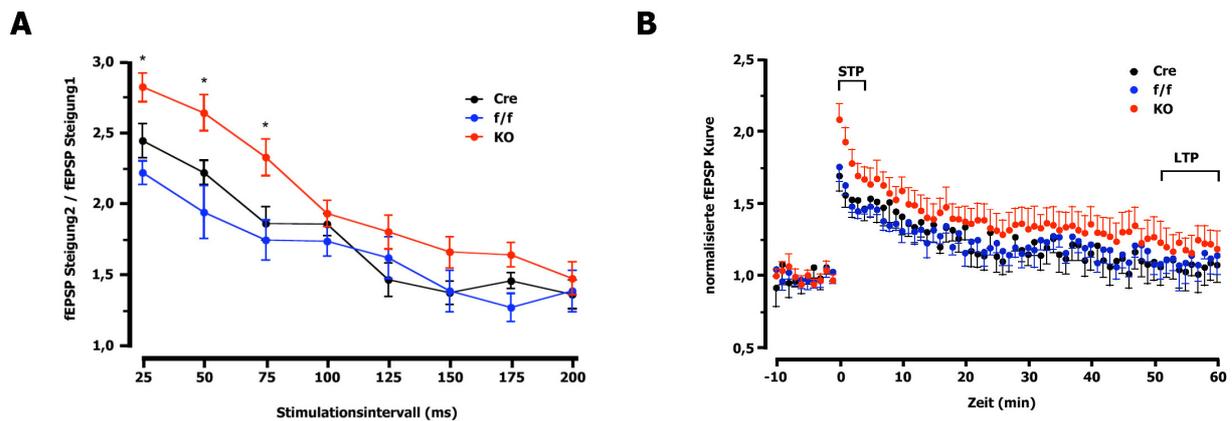
Mehrere *in vitro* Studien haben gezeigt, dass die Transkription von Neurotransmitter-Rezeptoren z.B. der NR2C-Untereinheit des NMDA-Rezeptors oder der GABA<sub>A</sub>β2-Untereinheit des GABA-Rezeptors vom Neuregulin-ErbB-Signalweg reguliert werden können [Ozaki et al. 1997; Rieff et al. 1999]. Daneben wurde auch beobachtet, dass NRG1 die Internalisierung der GLUR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors in hippocampalen Neuronen oder der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in Pyramidenzellen des präfrontalen Kortex fördert [Gu et al. 2005; Kwon et al. 2005]. Daher sollte untersucht werden, ob *in vivo* ein gezieltes postnatales Ausschalten des Signalweges in Pyramidenzellen zu einer veränderten Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren führt. Dafür wurde ebenfalls cDNA von sechs ErbB4 Nullmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) und drei homozygoten konditionalen ErbB4 Kontrolltieren (ErbB4<sup>ff</sup>), wie unter 4.3.2 beschrieben, verwendet. Dabei wurden weder im Expressionsniveau der GLUR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors noch der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im Kortex und Hippokampus Veränderungen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Weitere Expressionsanalysen der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante erfolgten zusammen mit der später generierten PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im Abschnitt 4.7.4 gezeigt.

### 4.3.4 Elektrophysiologische Analysen der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mausmutanten

Elektrophysiologische Analysen in Ratten und Mäusen konnten schon mehrfach einen Einfluss des Neuregulin-ErbB-Signalwegs auf die Ausbildung der LTP (Langzeit-Potenzierung; *long term potentiation*) im Hippokampus zeigen [Huang et al. 2000; Roysommuti et al. 2003; Kwon et al. 2005]. Dabei wurden hippocampale Schnittkulturen

wildtypischer Tiere verwendet und die Messungen meist an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse durchgeführt. Die Applikation der rekombinanten EGF- $\beta$ -Domäne von NRG1 reduzierte das LTP in diesen Studien. Allerdings konnte in einer Studie auch gezeigt werden, dass die Infusion der EGF- $\beta$ -Domäne die synaptische Transmission an der *Tractus perforans*-Gyrus Dentatus-Synapse *in vivo* verstärkt [Roysommuti et al. 2003]. Zelltyp-spezifische Mausmutanten bieten daher die Möglichkeit, die Funktion von ErbB4 bei der LTP Ausbildung speziell in Pyramidenzellen genauer zu analysieren. In Zusammenarbeit mit Dr. Weiqi Zhang (Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen) wurden Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) und homozygote konditionale ErbB4 Kontrolltiere (ErbB4<sup>ff</sup>) im Alter von 9-11 Wochen untersucht. Insgesamt wurden fünf Nullmutanten und vier Kontrollen analysiert. Zusätzlich wurden auch vier CaMKII-Cre Tiere untersucht. Dadurch sollte überprüft werden, ob die Expression des Cre-Rekombinase-Transgens bereits alleine eine Veränderung der LTP verursacht. Im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen enthielt diese Kontrollgruppe männliche und weibliche Tiere. Die Messungen zeigten keine Geschlechtsunterschiede und wurden daher zusammen dargestellt (Abb.12). Zunächst wurde untersucht, ob die präsynaptisch induzierten Ströme zu proportional steigenden extrazellulären exzitatorischen Feldpotentialen (fEPSP; *field excitatory postsynaptic potential*) in der Postsynapse führten, wobei die gemessenen Input/Output-Ströme der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse in der Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) unverändert waren. Zur Analyse von präsynaptischen Veränderungen wurde die Faszilitation gepaarter Pulse (PPF; *Paired-pulse facilitation*) gemessen. Die PPF war in der Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) größtenteils unverändert, bei kürzeren Stimulations-Intervallen war die PPF leicht erhöht (Abb.12). Möglicherweise liegen also moderate Veränderungen bei der Glutamat-Ausschüttung an der CA3-Präsynapse vor. Die Analyse der LTP-Messung ergab keine Veränderungen bei der Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) (Abb.12). Jedoch wurde eine geringe Verstärkung der *short-term potentiation* (STP) beobachtet. Die Analyse der AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme in CA1-Pyramidenzellen lieferten aber bisher kein eindeutiges Bild (vorläufige Daten).

Histologische und elektrophysiologische Untersuchungen der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante deuten also daraufhin, dass ErbB4 im adulten Gehirn nur in wenigen Pyramidenzellen des Kortex und Hippokampus exprimiert wird und nur einen geringen Einfluss auf die synaptische Transmission ausübt.



**Abb.12 Elektrophysiologische Analysen der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante**

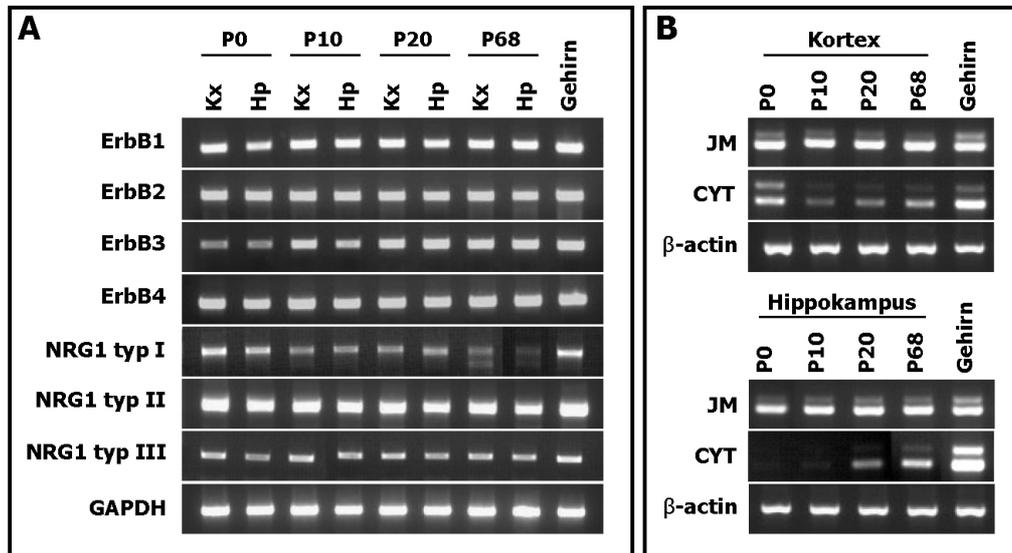
Fünf Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutanten (KO) wurden im Alter von 9-11 Wochen in Zusammenarbeit mit Dr. Weiqi Zhang elektrophysiologisch untersucht. Als Kontrolltiere wurden vier konditionale ErbB4 Mutanten (f/f) und vier CaMKII-Cre Mäuse (Cre) verwendet. Von der CaMKII-Cre Mauslinie wurden jeweils zwei Männchen und zwei Weibchen analysiert. Die Messungen sind zusammen dargestellt, da keine Geschlechtsunterschiede beobachtet wurden. (A) Die Analyse präsynaptischer Effekte erfolgte mit Hilfe der PPF-Messung. Das Verhältnis der Amplituden von der zweiten fEPSP zur ersten fEPSP Kurve wurde gegen die Interstimulusintervalle (25-200 ms) aufgetragen. Bei kürzeren Stimulationsintervallen wurde eine leichte Verstärkung der PPF in der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante beobachtet. (B) Es wurden keine Veränderungen bei der Ausbildung der LTP beobachtet. KO: CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>f/f</sup>; f/f: ErbB4<sup>f/f</sup>; Cre: CaMKII-Cre; LTP: Langzeit-Potenzierung (*long term potentiation*); PPF: *paired-pulse facilitation*

**4.4 Postnatale ErbB4-Expressionsanalyse in Wildtyp Mäusen**

Parallel zur Analyse der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante, wurde eine wildtypische Expressionsanalyse von ErbB4 durchgeführt. Das genaue Expressionsmuster von ErbB4 im adulten Gehirn wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Gerecke et al. 2001; Yau et al. 2003; Mechawar et al. 2007]. Bereits veröffentlichte Studien zur Analyse der ErbB4 Expression wurden in Ratten durchgeführt oder beschränkten sich auf embryonale und früh postnatale Stadien [Yau et al. 2003; Fox and Kornblum 2005]. Aus diesem Grund sollte genauer untersucht werden, welche Zelltypen im postnatalen und adulten Kortex und Hippokampus ErbB4 exprimieren.

Zunächst wurde die wildtypische Expression aller ErbB-Rezeptoren und der potentiellen Liganden NRG1 typ 1, typ II und typ III mit Hilfe einer RT-PCR-Analyse untersucht. Dafür wurde aus Hippokampus- und Kortex-Gewebe von vier Altersstadien (P0, P10, P20, P68) RNA präpariert und anschließend cDNA synthetisiert. Durch verschiedene Primerkombinationen (s. Tabelle 7) konnte in allen Altersstadien in beiden Regionen ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 nachgewiesen werden (Abb.13). NRG1 typ II und typ III wurden ebenfalls durchgehend exprimiert, während sich die Expression von NRG1 typ I mit

zunehmendem Alter abschwächte. Im Hippokampus und Kortex von Mäusen werden also ErbB-Rezeptoren und Liganden auch postnatal exprimiert. Zum besseren Verständnis der postnatalen Funktion wurde später genauer untersucht, in welchen Zellen ErbB4 vorliegt (s. 4.4.1).



**Abb.13 Expressionsanalyse der ErbB-Rezeptoren und NRG1-Liganden**

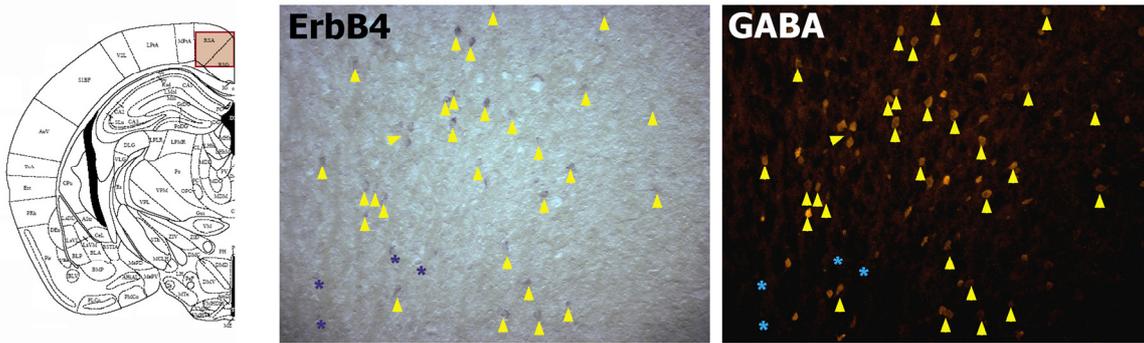
(A) PCR-Analyse von allen ErbB-Rezeptoren und den Liganden (NRG1 typ I, typ II, typ III) auf wildtypische Kortex- und Hippokampus-cDNA verschiedener Altersstadien (P0, P10, P20, P68). Gesamtgehirn cDNA diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O verwendet (Daten nicht gezeigt). Alle ErbB-Rezeptoren werden postnatal im Kortex und Hippokampus exprimiert (ErbB1 (435 bp): Primer 4587, 4588; ErbB2 (531 bp): Primer 4585, 4586; ErbB3 (433 bp): Primer 4583, 4584; ErbB4 (426 bp): Primer 4610, 4611). Die drei NRG1-Isoformen wurden postnatal im Kortex und Hippokampus nachgewiesen, wobei die Expression von NRG1 typ I mit zunehmendem Alter etwas schwächer wurde (NRG1 typ I (735 bp): Primer 4582, 5409; NRG1 typ II (509 bp): Primer 4697, 4698; NRG1 typ III (693 bp): Primer 4579, 4582). Als Kontrolle für die cDNA Qualität diente eine GAPDH-PCR (GAPDH (421 bp): Primer 5479, 5480). (B) ErbB4-Isoform-spezifische PCR-Analyse auf wildtypische Kortex- und Hippokampus-cDNA von den vier Altersstadien P0, P10, P20 und P68. Gesamtgehirn cDNA wurde als Positivkontrolle verwendet. Vier alternative ErbB4-Isoformen können durch alternatives Splicen gebildet werden. Die JMa- und JMb-Isoformen (JM) wurden ebenso wie die CYT1- und CYT2-Isoformen (CYT) zusammen amplifiziert. In allen vier Alterstadien konnten alle vier Isoformen nachgewiesen werden. Im Hippokampus nimmt die Expression mit zunehmendem Alter leicht zu. Die β-actin PCR diente zur Qualitätskontrolle der cDNA. (JMa (273 bp) und JMb (243 bp): Primer 5615, 5616; CYT1 (251 bp) und CYT2 (203 bp): Primer 5614, 5617) Hp: Hippokampus; Kx: Kortex; P: Postnataltag

Durch alternatives Splicen können vier verschiedene ErbB4-Isoformen gebildet werden. Deshalb wurde mit Hilfe einer RT-PCR-Analyse untersucht, welche ErbB4-Isoformen im postnatalen Gehirn von Wildtyp Mäusen exprimiert werden. Dafür wurde ebenfalls die Hippokampus- und Kortex-cDNA von vier Alterstadien (P0, P10, P20, P68) verwendet und eine Reihe isoformspezifischer PCR-Analysen durchgeführt. Die „juxtamembrane“ Region

wurde mit den Primern 5615 und 5616 amplifiziert (Abb.13). Liegen beide Splicevarianten vor, werden zwei Banden amplifiziert. Die um 30 bp größere, proteolytisch prozessierbare JMa erzeugt eine 273 bp große Bande, während JMb nur eine 243 bp Bande generiert. In allen vier Altersstadien konnten beide Isoformen nachgewiesen werden. Mit den Primern 5614 und 5617 wurde die Region um die potentielle Bindestelle der PI3 Kinase analysiert. Ist die Bindestelle vorhanden (CYT1 Isoform), erzeugt die PCR eine 251 bp Bande. Bei der CYT2 Isoform (ohne PI3-Kinase Bindestellen) entsteht dagegen nur eine 203 bp große Bande. Im Kortex konnten beide Isoformen in allen Altersstadien nachgewiesen werden. Mit dieser Methode können nur bedingt quantitative Aussagen getroffen werden. Die Ergebnisse deuten aber im Hippokampus auf eine steigende Expression des Rezeptors mit zunehmendem Alter hin (Abb.13). Die  $\beta$ -actin PCR wurde zur Qualitätskontrolle der cDNA durchgeführt. Durch diese RT-PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle vier ErbB4 Splicevarianten im postnatalen Kortex und Hippokampus exprimiert werden. Allerdings ist diese Methode nicht geeignet die Expression einzelner ErbB4-Isoformen bestimmten Zelltypen zuzuordnen. Eine detaillierte Untersuchung erfolgte später mit Hilfe der Einzelzell-RT-PCR-Analyse (s. 4.4.2).

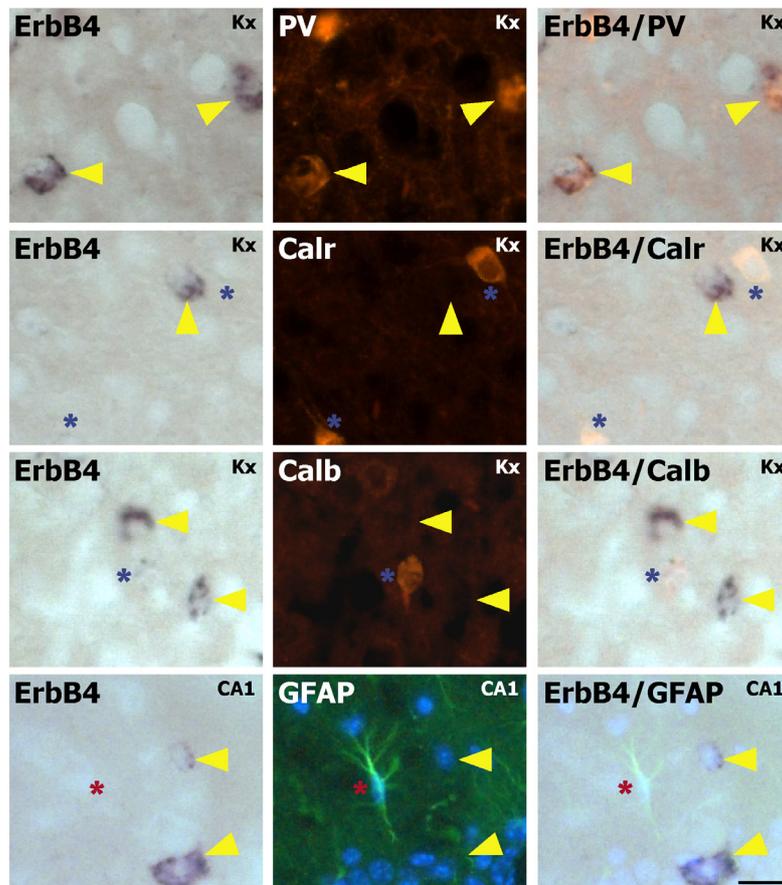
#### 4.4.1 Zelltyp-spezifische Analyse der postnatalen ErbB4-Expression im Kortex und Hippokampus

Zu Beginn der Expressionsanalyse wurden vier verschiedene ErbB4 Antikörper auf Paraffin-, Vibratom- und Kryostatschnitten getestet, wobei Gewebe von verschiedenen ErbB4 Nullmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; „heart rescue knock-out“) als Negativkontrolle verwendet wurde. Diese lieferten jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse und zeigten oftmals eine sehr starke Hintergrundfärbung (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde die Expressionsanalyse mit Hilfe einer chromogenen *in situ* Hybridisierung (ISH) auf frontalen Kryostatschnitten von P25 alten Wildtyp Mäusen fortgesetzt. Insgesamt wurden in zwei unabhängigen Versuchen Schnitte von drei verschiedenen Tieren verwendet. Zur Herstellung der ErbB4-cRNA-Sonde wurde das Plasmid pCDNA3 ErbB4 verwendet, welcher das 3,878 kb große offene Leseraster (ORF) der JMa/CYT2-Variante von ErbB4 enthält. Dafür wurde es mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert und aufgereinigt. Die cRNA-Sonde wurde anschließend mit der SP6 RNA Polymerase transkribiert und zum Verstärken des ISH-Signals hydrolysiert. Um zu untersuchen, in welchen Zellen des Kortex und Hippokampus ErbB4-mRNA exprimiert wird, wurde die chromogene ISH mit einer fluoreszenten Immunhistochemie (IHC) kombiniert. Dabei ist zu beachten, dass nach einer ISH nicht alle Antigene noch zugänglich für die Antikörper sind. So konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nur eine begrenzte Anzahl von Antikörpern für die Koexpressionsanalyse verwendet werden. Erste Doppelfärbungen zeigten, dass im Kortex bei P20 ein Großteil der ErbB4-mRNA exprimierenden Zellen GABAerge Interneurone sind (Abb.14).



**Abb.14 ErbB4 wird postnatal überwiegend in GABAergen Interneuronen exprimiert**  
 Kombination von chromogene *erb4*-ISH mit fluoreszenter GABA-Immunfärbung auf 14 µm dicken, frontalen Kryostatschnitten von Wildtyp Mäusen. Die meisten ErbB4-mRNA exprimierenden Zellen im Kortex von 20 Tage alten Mäusen sind GABAerge Interneurone. Die untersuchte Kortex-Region ist schematisch dargestellt. (Gelbe Pfeilspitzen: doppelgefärbte Zellen; blaue Sternchen: nur ErbB4-mRNA positive Zellen).

Zur Analyse der zahlreichen Typen von Interneuronen wurden Antikörper für die Calciumbindenden Proteine Parvalbumin (PV), Calretinin und Calbindin erfolgreich auf P25-Gehirnschnitten eingesetzt. Während die Parvalbumin-IHC eine nahezu vollständige Überlappung mit der ErbB4-ISH zeigte, gab es fast keine Zellen, die sowohl Calretinin bzw. Calbindin als auch ErbB4-mRNA exprimierten (Abb.15). Eine Quantifizierung ergab, dass nahezu 90% der PV positiven Interneurone im Kortex und in der CA1-Region des Hippokampus ErbB4-mRNA koexprimierten (Abb.16). Dagegen waren im Kortex nur etwa die Hälfte der ErbB4-mRNA exprimierenden Zellen PV positiv, im Hippokampus lediglich ~30%. Es wurden aber insgesamt deutlich weniger PV Interneurone mit der IHC markiert als ErbB4-mRNA exprimierende Zellen mit der ISH. Deshalb wurde kontrolliert, ob die PV-IHC durch die vorausgehende chromogene ISH abgeschwächt oder das fluoreszente Signal durch die chromogene Färbung unterdrückt wird. Daher wurde auf Kryostatschnitten eine fluoreszente PV-IHC durchgeführt, ohne dass vorher eine ISH stattfand. Die Anzahl der PV positiven Interneurone erhöhte sich dadurch nicht. Die chromogene ISH verschlechterte also nicht das Ergebnis der IHC. Deshalb wurde ebenfalls auf Kryostatschnitten eine chromogene PV-ISH durchgeführt, um herauszufinden, ob mit dieser häufig sensitiveren Methode mehr PV positive Interneurone markiert werden können. Zur Herstellung der PV cRNA-Sonde wurde der 333 bp große Parvalbumin ORF in pGEM-T kloniert. Das Plasmid wurde mit NotI linearisiert und die ISH-Sonde mit der SP6 RNA Polymerase transkribiert. Durch die PV-ISH konnten im Vergleich zu der IHC im Kortex und im Hippokampus jeweils fast doppelt so viele Interneurone detektiert werden (Abb.16). Es gibt also PV-mRNA exprimierende Interneurone, die mit der IHC nicht markiert werden konnten. Daher besteht die Möglichkeit, dass mehr ErbB4-mRNA exprimierende Zellen PV positiv sind als durch die Kombination dieser Methoden festgestellt werden kann.

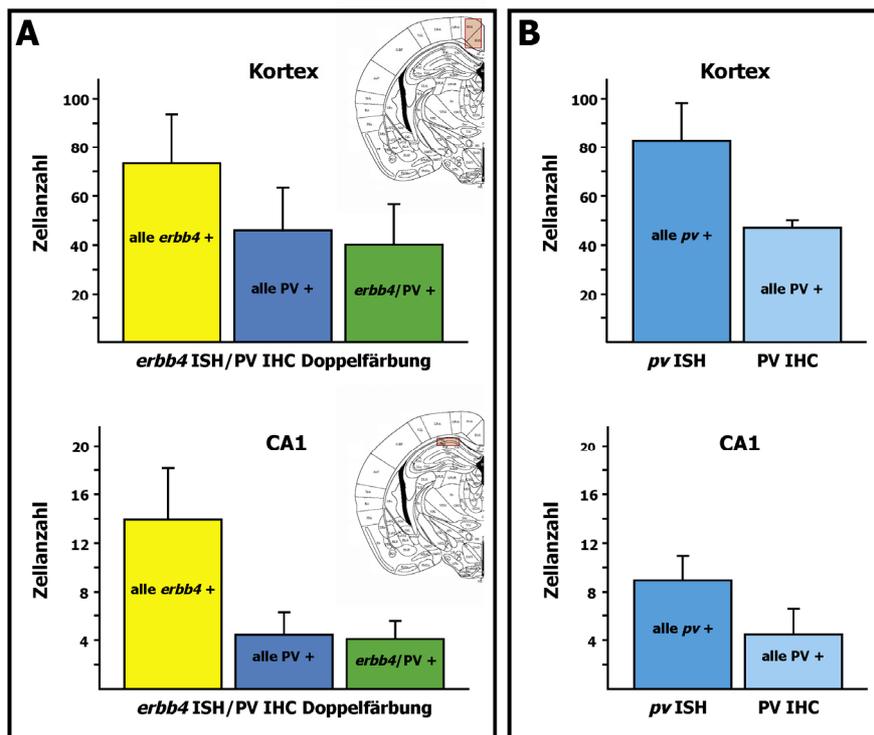


**Abb.15 Analyse der ErbB4-Expression in Interneuronen und Astrozyten**

Zelltyp-spezifische Analyse der ErbB4-Expression durch Kombination von chromogener *erbB4*-ISH mit fluoreszenten Immunfärbungen auf 14 µm dicken, frontalen Kryostatschnitten. Doppelfärbungen mit interneuronalen Markern (PV, Calr, Calb) wurde auf Kryostatschnitten von 25 Tage alter Wildtyp Mäusen durchgeführt (Ausschnitte aus dem Kortex). Für die Expressionsanalyse in Astrozyten wurden Kryostatschnitte von 50 Tage alte konditionale ErbB4 Mausmutanten (*ErbB4<sup>fl</sup>*) verwendet (Ausschnitte aus der CA1-Region des Hippokampus). Ein Großteil PV positiver Interneurone kolokalisiert mit ErbB4-mRNA exprimierenden Zellen (Gelbe Pfeilspitzen: doppelgefärbte Interneurone). Calretinin oder Calbindin positive Interneurone exprimieren keine ErbB4-mRNA (Gelbe Pfeilspitzen: ErbB4-mRNA exprimierende Neurone; blaue Sternchen: Calretinin bzw. Calbindin positive Interneurone). In GFAP positiven Astrozyten wurde keine ErbB4-mRNA-Expression beobachtet (Gelbe Pfeilspitzen: ErbB4-mRNA exprimierende Neurone; blaue Sternchen: GFAP positive Astrozyten). Calb: Calbindin; Calr: Calretinin; CA1: CA1-Region des Hippokampus; Kx: Kortex PV: Parvalbumin; Maßstabsbalken entspricht 20 µm, gültig für alle Bilder

Wahrscheinlich wird ErbB4 aber noch von anderen Zelltypen exprimiert. So wurde vor allem im Hippokampus von Ratten eine Koexpression mit nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*) gezeigt [Yau et al. 2003]. Gegen nNOS gerichtete Antikörper erzeugten nach der ISH auf den Kryostatschnitten kein auswertbares Signal und konnten somit nicht für die Analyse eingesetzt werden. Ähnliche Probleme gab es beim Nachweis weiterer interneuronaler Marker, CCK (Cholecystokinin) und Somatostatin. Die Expression von ErbB4 in Pyramidenzellen konnte mit dieser Methode ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da die getesteten CaMKII Antikörper nach der chromogenen ISH kein Signal erzeugten. Eine nicht überlappende Expression von ErbB4-mRNA und dem Astrozytenmarker GFAP konnte

hingegen im Kortex und Hippokampus von P50-Tieren gezeigt werden (Abb.15). In einer aktuellen Studie wurde im Kortex von früh postnatalen Ratten ebenfalls keine Kolo­kalisierung von ErbB4 und GFAP beobachtet [Mechawar et al. 2007]. Die kortikale Expression von ErbB4 scheint sich somit auf Neurone zu beschränken und hierbei verstärkt in Interneuronen aufzutreten. So wurde der Rezeptor in nahezu allen mit dieser Methode detektierbaren PV positiven Interneuronen nachgewiesen. In Zukunft ist zudem eine Analyse der ErbB4-Expression in Oligodendrozyten geplant. Außerdem sollen gegen interneuronale Marker gerichtete Antikörper getestet werden.



**Abb.16 Parvalbumin positive Interneurone exprimieren ErbB4-mRNA**

(A) Kombination von *erbb4*-ISH mit fluoreszenter PV-IHC auf 14 µm dicken, frontalen Kryostatschnitten Wildtyp Mäusen (P25). Quantitative Analyse der ErbB4-mRNA und PV exprimierenden Zellen im Kortex und der CA1-Region des Hippokampus. Die untersuchten Regionen sind schematisch dargestellt. Der überwiegende Anteil der PV positiven Interneurone im Kortex (87%) und der CA1-Region des Hippokampus (90%) exprimieren ErbB4-mRNA. Vor allem in der CA1-Region des Hippokampus konnten jedoch mehr ErbB4-mRNA exprimierende Zellen als PV positive Interneurone detektiert werden (Gelbe Balken: alle *erbb4* positiven Zellen; blaue Balken: alle PV positiven Interneurone; grüne Balken: doppeltgefärbte Interneurone). (B) Analyse der PV-mRNA- und PV-Expression im Kortex und in der CA1-Region des Hippokampus. Es wurden dieselben Regionen wie unter (A) dargestellt untersucht. Um zu überprüfen, ob mehr PV positive Interneurone existieren als bei der Doppelfärbung nachgewiesen werden konnte (s. A), wurde eine PV-ISH und PV-Immunfärbung separat auf wildtypische 14 µm dicke, frontale Kryostatschnitte bei P25 durchgeführt. Im Kortex und Hippokampus konnten auf RNA-Ebene mit der *pv*-ISH annähernd doppelt so viele PV positive Interneurone wie mit der PV-IHC detektiert werden. Möglicherweise überlappt daher die ErbB4- und PV-Expression stärker als in (A) beobachtet (Dunkelblaue Balken: alle PV-mRNA exprimierende Interneurone; hellblaue Balken: alle PV exprimierende Interneurone). IHC: Immunhistochemie; ISH: *in situ* Hybridisierung; PV: Parvalbumin

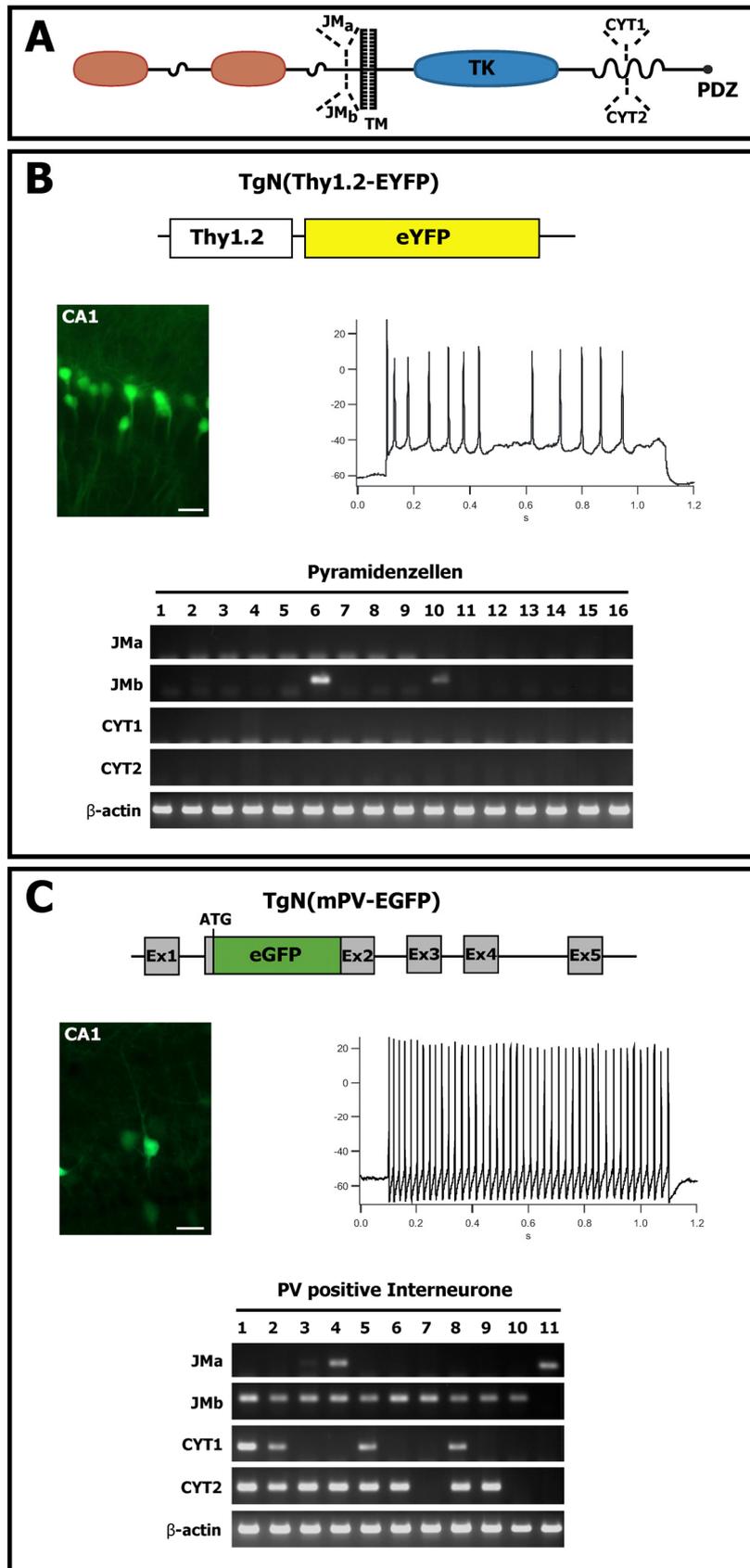


Abb.17 Isoform-spezifische ErbB4 Expressionsanalyse mit Hilfe von Einzelzell-RT-PCR

**Abb.17 (siehe vorangegangene Seite)**

(A) Schematische Darstellung des ErbB4-Proteins, die durch alternatives Splicen gebildeten Isoformen sind eingezeichnet. TK: Tyrosinkinase; PDZ: PDZ-Binde-Domäne  
 (B) Zur Analyse der ErbB4-Expression in Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus wurde die Mauslinie TgN(Thy1.2-EYFP) verwendet, deren Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippokampus gelb fluoreszieren. Die 16 *gepatchten* Pyramidenzellen zeigten ein typisches adaptives Aktivitätsmuster. Die cDNA wurde ausgehend vom Zytoplasma einer Zelle synthetisiert und in zwei Amplifikationsrunden einer Multiplex-PCR-Analyse eingesetzt. In der ersten Amplifikationsrunde wurde die „*juxtamembrane*“ Region sowie die Region um die potentielle PI3 Kinase Bindestelle und zur Kontrolle  $\beta$ -actin amplifiziert (JM (502 bp): Primer 5616, 4610; CYT (520 bp): Primer 8309, 8304;  $\beta$ -actin (394 bp): Primern 4262, 4264). In der zweiten Amplifikationsrunde wurde ausgehend von 3  $\mu$ l der ersten PCR jede ErbB4-Isoform einzeln sowie als Kontrolle  $\beta$ -actin amplifiziert. (JMa (104 bp): Primer 5619, 5615; JMb (137 bp): Primer 5618, 5615; CYT1 (165 bp): Primer 5620, 5614; CYT2 (134 bp): Primer 8306, 5614;  $\beta$ -actin (261 bp): Primer 9047, 9048). Nur in zwei Pyramidenzellen konnte die JMb-Isoform nachgewiesen werden. Maßstabsbalken: 25  $\mu$ m  
 (C) Die ErbB4-Expression in PV positiven Interneurone der CA1-Region des Hippokampus wurde mit Hilfe der Mauslinie TgN(mPV-eGFP) untersucht, deren PV positiven Interneurone grün fluoreszieren. Die 11 *gepatchten* Interneurone zeigten überwiegend ein „*fast spiking*“ Aktivitätsmuster. Die cDNA wurde ausgehend vom Zytoplasma einer Zelle synthetisiert. Die PCR-Analyse erfolgte wie unter (B) beschrieben. In allen PV positiven Interneuronen konnte ErbB4 nachgewiesen werden, dabei wurden die JMb- und CYT2-Isoformen am häufigsten exprimiert. Maßstabsbalken: 25  $\mu$ m

#### 4.4.2 Isoform-spezifische Expressionsanalyse von ErbB4 in der CA1-Region des Hippokampus

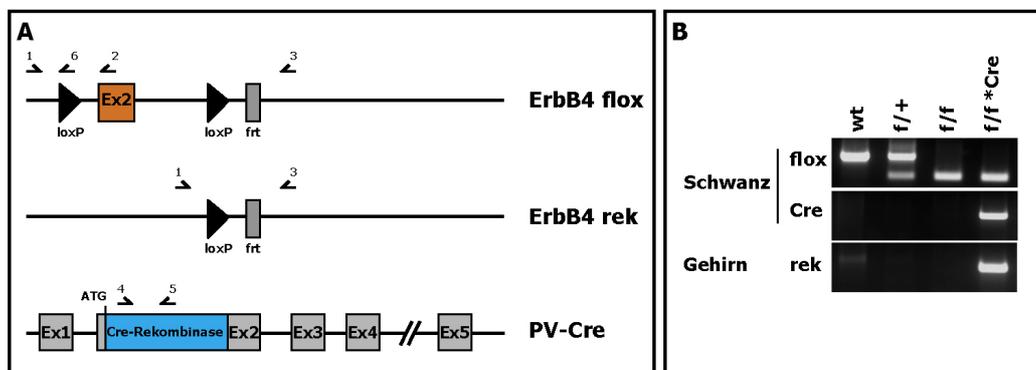
Für ein genaueres Verständnis der postnatalen Funktion von ErbB4 ist es nicht nur entscheidend, welche Zellen den Rezeptor exprimieren, sondern auch welche Isoformen vorliegen. Für eine genauere Analyse der Expression von ErbB4 Splicevarianten wurde daher eine Einzelzell-RT-PCR in der CA1-Region des Hippokampus durchgeführt. Außerdem sollte noch einmal untersucht werden, in welchen Neuronen ErbB4 exprimiert wird. Diese Analyse wurde mit Hilfe transgener Mäuse durchgeführt, die fluoreszente Proteine zelltyp-spezifisch exprimieren (Abb.17). Die Mauslinie (Thy1.2-EYFP) exprimiert eYFP (*enhanced Yellow Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des Thy1.2 Promotors und markiert auf diese Weise speziell die Pyramidenzellen u. a. im Hippokampus (Hirrlinger et al., 05). Dagegen wird bei der Mauslinie (mPV-eGFP) eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des Parvalbumin Promotors exprimiert [Meyer et al. 2002]. In diesen Mäusen sind somit die PV positiven Interneurone grün fluoreszierend (Abb.17). Diese Markierungen ermöglichen es, gezielt Pyramidenzellen und PV positive Interneurone zu untersuchen. Die Einzelzell-RT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Swen Hülsmann durchgeführt (Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen). Es wurden zwei (Thy1.2-EYFP) bzw. drei (mPV-eGFP) transgene Mäuse im Alter von P17 bis P24 verwendet. Es konnten 16 Pyramidenzellen und 11 PV positive Interneurone analysiert werden. Die Pyramidenzellen zeigten dabei ein typisches adaptierendes Aktivitätsmuster,

während PV positive Interneurone zum großen Teil ein „*fast spiking*“ Aktivitätsmuster aufwiesen (Abb.17). Ausgehend vom Zytoplasma einer Zelle (mit etwa 10 bis 50 pg RNA) wurde cDNA synthetisiert und anschließend in zwei Amplifikationsrunden einer PCR eingesetzt. Dabei wurde ein Multiplex-PCR durchgeführt. In der ersten Amplifikationsrunde wurde ein 502 bp großes Produkt der „*juxtamembrane*“ Region amplifiziert, das beide Splicevarianten umfasste, sowie eine 520 bp große Region um die potentielle PI3-Kinase Bindestelle. Zusätzlich wurde als Kontrolle 394 bp von  $\beta$ -actin amplifiziert. In der zweiten Amplifikationsrunde wurde jede ErbB4 Isoform einzeln amplifiziert. Die JM-Isoformen wurden mit *sense* Primern amplifiziert, die in dem jeweiligen dafür kodierenden Exon lagen. Dabei wurde mit den Primern 5619 und 5615 eine JMa spezifische 104 bp große Bande und in einer separaten PCR mit den Primern 5618 und 5615 eine JMb spezifische 137 bp große Bande erzeugt. Für die CYT1-Isoform wurde ebenfalls ein *sense* Primer (5620) verwendet, der im dafür kodierenden Exon lag. Dieser erzeugte zusammen mit dem Primer 5614 eine 165 bp große Bande. Im Fall von CYT2 wird das Exon, das die Bindestelle für die PI3-Kinase kodiert, herausgespleißt. Deshalb wurde ein *sense* Primer (8306) verwendet, der teilweise auf dem vorausgehenden und dem folgenden Exon lag. Zusammen mit dem Primer 5614 wurde eine 134 bp Bande generiert. Mit den Primern 9047 und 9048 wurde  $\beta$ -actin als Positivkontrolle amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde *Patch*-Lösung mit und ohne reverser Transkription, sowie ddH<sub>2</sub>O, verwendet. Nur in zwei der *gepatchten* Pyramidenzellen wurde mittels Isoform-spezifischen RT-PCRs die JMb-Isoform nachgewiesen (Abb.17). Der überwiegende Teil der Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippokampus exprimiert daher postnatal kein oder nur sehr geringe Mengen des ErbB4-Rezeptors. Dagegen konnte in allen der elf *gepatchten* PV positiven Interneuronen ErbB4-Signale erzeugt werden. In zehn Zellen wurde JMb nachgewiesen, in acht Fällen die CYT2-Isoform. Damit sind diese beiden nicht prozessierbaren Isoformen die häufigsten ErbB4-Varianten. Die JMa-Variante wurde nur in zwei Zellen und CYT1 in vier Zellen amplifiziert. Postnatal scheinen diese beiden Isoformen daher seltener in der CA1-Region des Hippokampus vorzukommen. Diese Ergebnisse bestätigen die Koexpressionsanalyse, bei der ebenfalls nahezu alle PV positiven Interneurone ErbB4-mRNA exprimierten. Dagegen wird innerhalb des Hippokampus der Rezeptor postnatal nur in wenigen Pyramidenzellen auf einem nachweisbaren Niveau exprimiert.

#### 4.5 Herstellung einer PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante

Die Daten der wildtypischen Expressionsanalyse zeigen eine prominente ErbB4 Expression in PV positiven Interneuronen während postnataler Stadien. Eine Funktion von ErbB4 wurde bereits bei der Migration von Interneuronen nachgewiesen [Anton et al. 2004; Flames et al. 2004]. Um die postnatale Funktion von ErbB4 in Interneuronen zu analysieren, wurde die

konditionale ErbB4 Nullmutante mit einer transgenen Mauslinie (mPV-Cre) gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Parvalbumin Promotors exprimiert [Fuchs et al. 2007]. Dadurch wird ErbB4 postnatal spezifisch in PV positiven Interneuronen ausgeschaltet. Die Deletion von Exon 2 wurde in den Nullmutanten (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) mit Hilfe einer PCR auf genomische DNA aus Schwanz- und Gehirngewebe überprüft. Die DNA aus Gehirngewebe diente dem Nachweis der Rekombination. Durch die Deletion des Exon 2 von ErbB4 kann mit den Primern 5893 und 9134 eine 600 bp große Bande erzeugt werden, während im Wildtyp (2,5 kb) und in der konditionalen ErbB4 Mausmutante (2,9 kb) deutlich größere Amplifikationsprodukte entstünden. Wie erwartet, wurde nur in Mäusen, die sowohl das gefloxtete ErbB4-Allel als auch das Cre-Rekombinase Transgen enthalten, die Rekombination des ErbB4-Allels im Gehirn nachgewiesen (Abb.18).



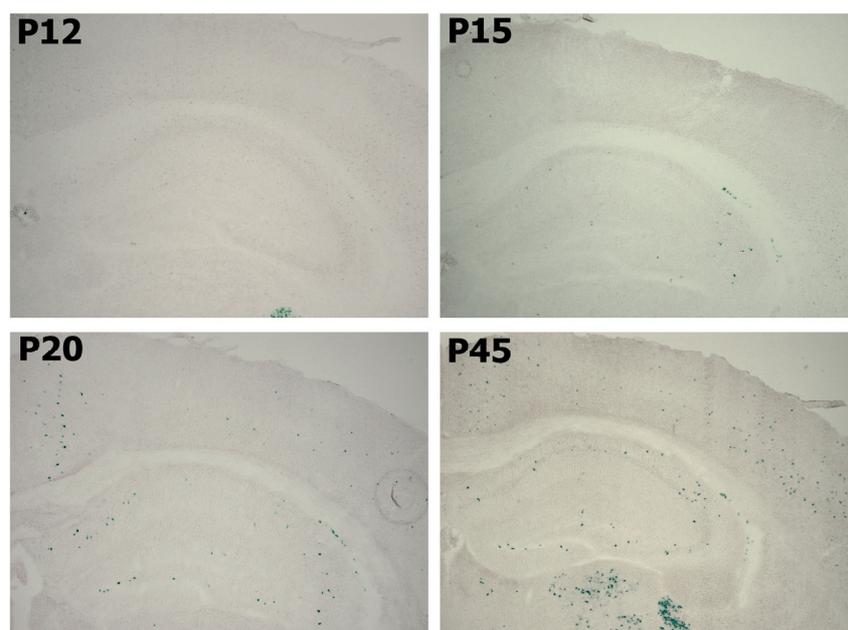
**Abb.18 Rekombinationsnachweis in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante.**

(A) Schematische Darstellung des gefloxteten ErbB4-Locus vor und nach der Cre-Rekombinase vermittelten Rekombination sowie des PV-Cre Transgens. Die für die PCR-Analyse (s. B) verwendeten Primer sind eingezeichnet. (B) PCR auf genomische DNA von Schwanzbiopsiematerial und Gehirngewebe. Oben: Primer 1 und 2 amplifizieren ein 360 bp großes Produkt vom wt-Allel, Primer 1 und 6 ein 200 bp großes Produkt vom gefloxteten ErbB4-Allel. In heterozygoten ErbB4 Mutanten (ErbB4<sup>f/+</sup>) werden beide Produkte erzeugt. Mitte: Nachweis des Cre-Rekombinase-Transgens (Cre (550 bp) ); Primer 4, 5). Unten: Die Rekombination wurde nur im Gehirn von ErbB4 Mausmutanten (mPV-Cre \* ErbB4<sup>ff</sup>) mit den Primern 1 und 3 nachgewiesen, die eine 600 bp Bande nach der Deletion des Exon 2 erzeugen. Primer: 1 = 5893; 2 = 6369; 3 = 9134; 4 = 5383; 5 = 5382; 6 = 7397; rek: rekombiniert

#### 4.6 Bestimmung des Cre-Rekombinase vermittelten Rekombinationsmusters der mPV-Cre Mauslinie

Die mPV-Cre Mauslinie wurde mit der Reporter-Mauslinie (ROSA26-stopp-LacZ) verpaart, um den genauen Expressionsbeginn der Cre-Rekombinase und deren Expressionsmuster zu untersuchen. Die Reporter-Mauslinie enthält einen in allen Zellen aktiven ROSA Promotor, gefolgt von einer gefloxteten Stoppkassette mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionskassette.

Durch die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion der Stoppkassette wird das Enzym exprimiert, wobei dessen Aktivität mit der X-Gal Histochemie nachgewiesen werden kann. Es wurden frontale Kryostatschnitte von Gehirnen doppeltransgener Mausmutanten im Alter von P12, P15, P20 und P45 hergestellt und eine X-Gal Histochemie durchgeführt. Dabei konnten im Kortex und Hippokampus bei P15 die ersten Cre-Rekombinase exprimierenden Interneurone detektiert werden (Abb.19). Die Anzahl rekombinierter Zellen nahm bis P45 zu. Im Hippokampus exprimiert der überwiegende Anteil der PV positiven Interneurone die Cre-Rekombinase, im Kortex sind es dagegen nur etwa 50% [Fuchs et al. 2007]; vorliegende Arbeit]. Bereits bei P12 konnte eine Cre-Rekombinase Expression im Kleinhirn und im *Nucleus reticularis thalami* (netzartiger Thalamuskern) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die Analyse der Mausmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) ist dies allerdings nicht entscheidend, da ErbB4 nicht im Thalamus exprimiert wird und im Kleinhirn ab etwa P20 nicht mehr nachweisbar ist [Rio et al. 1997; Ozaki et al. 1998]. Die Mauslinie ist daher für die Analyse der postnatalen Funktion von ErbB4 in PV positiven Interneuronen geeignet.



**Abb.19 Expression der Cre-Rekombinase in der mPV-Cre Mauslinie**

Zur Analyse der Cre-Rekombinase-Expression wurde die mPV-Cre Mauslinie mit einer Reporter-Mauslinie (ROSA26-stopp-LacZ) verpaart. Auf 14 µm dicken, frontalen Kryostatschnitten von doppeltransgenen Mäusen im Alter von P12, P15, P20 und P45 wurde eine X-Gal-Histochemie durchgeführt. Cre-Rekombinase exprimierende Zellen sind blau gefärbt. Bei P15 wurden im Kortex und Hippokampus die ersten Cre-Rekombinase exprimierenden Interneurone detektiert, deren Anzahl bis P45 zunahm.

## 4.7 Charakterisierung der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante

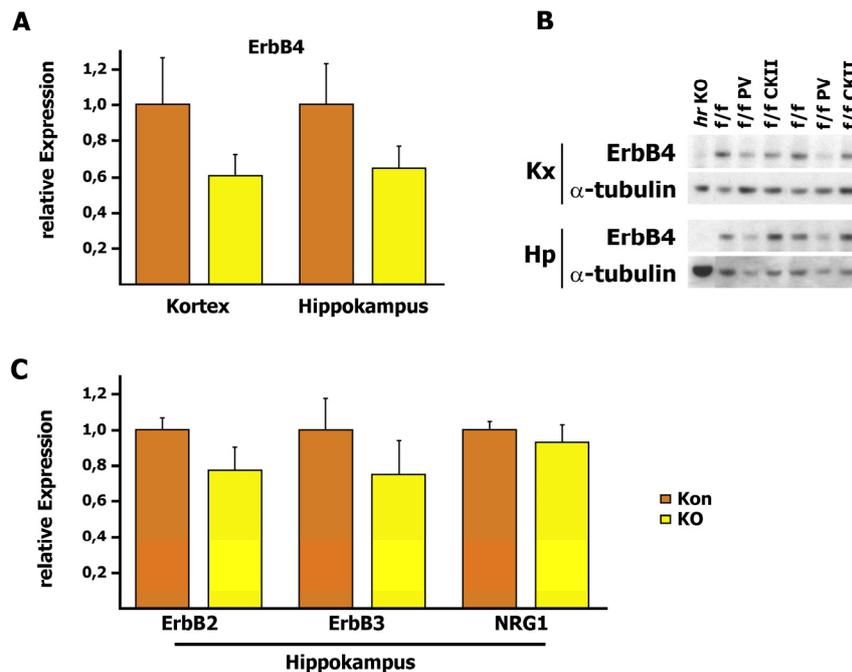
Die PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutanten (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) zeigten keine ausgeprägten phänotypischen Veränderungen. Einige Mutanten hatten allerdings ein geringeres Gewicht im Vergleich zu Geschwistertieren, was vermutlich durch die relativ starke Expression von Parvalbumin im Skelettmuskel verursacht wird. So führt die Deletion von ErbB4 im embryonalen Skelettmuskel zu einer 30%igen Gewichtsreduktion, ohne einen Einfluss auf die Bildung der NMJ (*neuromuscular junction*) zu haben [Escher et al. 2005]. Tiere mit Gewichtsreduktion zeigten in den folgenden Analysen keine Veränderungen im Vergleich zu normalgewichtigen Mutanten. Die PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutanten wiesen eine normale Lebenserwartung auf. Bei männlichen Tieren, die sowohl das gefloxtete ErbB4-Allel als auch die Cre-Rekombinase exprimierten, konnte in einigen Fällen eine Keimbahnrekombination beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden für die Verpaarungen nur weibliche doppeltransgene Mäuse eingesetzt, die das gefloxtete ErbB4-Allel und das Cre-Rekombinase Transgen tragen. Die Wurfgrößen waren durchschnittlich, das Cre-Rekombinase Transgen wurde aber mit einer etwas geringeren Wahrscheinlichkeit als erwartet weitergegeben. Nur ca. 40% der Nachkommen enthielten das Transgen, anstelle der nach Mendel erwarteten 50%. Diese Beobachtung wurde unabhängig von dem gefloxteten ErbB4-Allel ebenfalls in der Erhaltungszucht der Mauslinie (mPV-Cre) gemacht. Der Grund für die etwas verringerte Weitergabe des Transgens ist zurzeit noch unklar.

### 4.7.1 Analyse der ErbB4-Expression im Kortex und Hippokampus von Zelltyp-spezifischen ErbB4 Nullmutanten

Die mPV-Cre Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase nicht in allen Parvalbumin positiven Interneuronen [Fuchs et al. 2007]. Außerdem ergab die wildtypische Expressionsanalyse, dass ErbB4 vermutlich auch in anderen Interneuronen und einigen Pyramidenzellen vorkommt (s. 4.4). Daher sollte mit Hilfe verschiedener Methoden die Reduktion der ErbB4-Expression in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) genauer analysiert werden.

Zunächst wurde mit einer qRT-PCR-Analyse die Expression der ErbB-Rezeptor-Familie und des Liganden NRG1 untersucht. Dafür wurde die RNA von Kortex- und Hippokampus-Gewebe von sechs Nullmutanten (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) und fünf konditionalen ErbB4 Kontrolltieren (ErbB4<sup>ff</sup>) präpariert. Die RNA von Tieren mit dem gleichen Genotyp wurde zusammengefasst und ausgehend von 1 µg dieser RNA-Mischungen eine cDNA-Synthese durchgeführt. Dadurch wurden nicht einzelne Tiere, sondern zwei Gruppen miteinander verglichen, wodurch die Expressionsanalyse einer größeren Anzahl von Genen ermöglicht

wurde. Die Normalisierung der eingesetzten RNA-Mengen erfolgte im Bezug auf die drei Haushaltsgene ATB5b,  $\beta$ -actin und 18S-RNA. Sowohl im Hippokampus als auch im Kortex der ErbB4 Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) war die ErbB4-Expression deutlich reduziert (Abb.20). Außerdem wurde eine etwas geringere ErbB2- und ErbB3-Expression nachgewiesen (Abb.20). Die Expression des Liganden NRG1 war dagegen unverändert. Die leichte Reduktion der ErbB2- und ErbB3-Expression deutet auf gegenseitige Regulationsmechanismen der Rezeptoren hin.

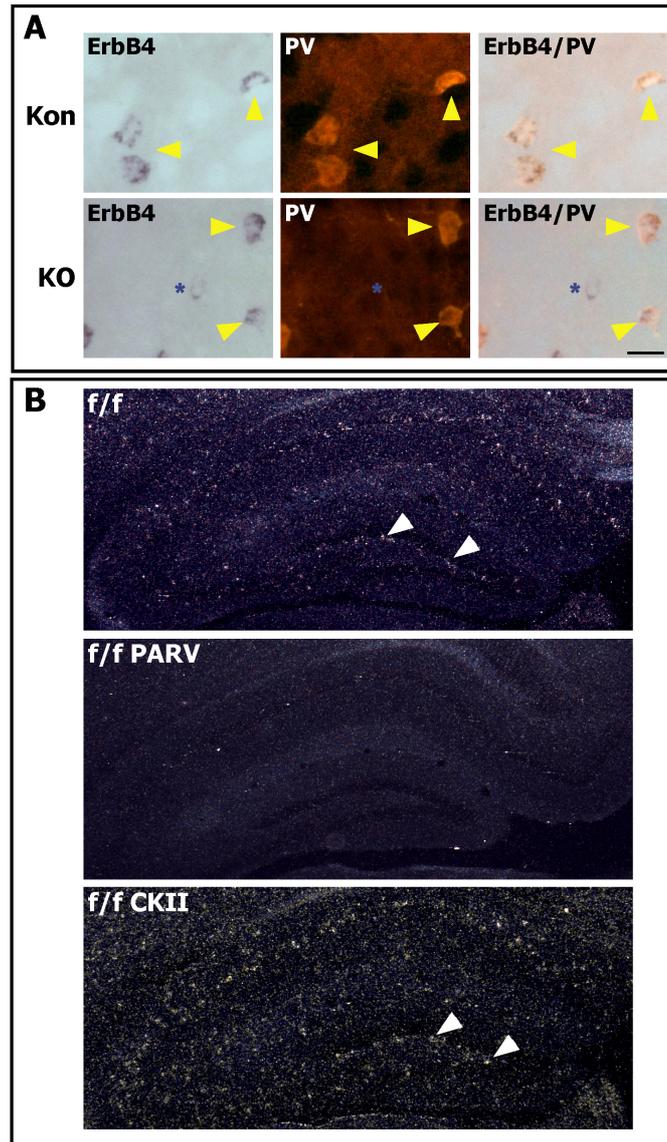


**Abb.20 Reduktion der ErbB4-Expression in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante**

(A, C) Quantitative *real time* PCR-Analyse mit cDNA aus Kortex- und Hippokampus-Gewebe von 3 Monate alten Mäusen. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Kontrolltieren (Kon) verglichen. Für die Analyse wurde jeweils die cDNA von sechs Nullmutanten bzw. von fünf Kontrolltieren zusammengefasst. (A) Deutliche Reduktion der ErbB4-Expression im Kortex und Hippokampus der PV-Interneuron-spezifischen Nullmutante. Die verwendeten Primer (11383, 11385) liegen in Exon 2 und Exon 3 des ErbB4-Gens. KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>; Fehlerbalken: Standardfehler (B) Analyse der ErbB4-Expression auf Protein-Ebene durch *Western Blots* im Kortex und Hippokampus von 3 Monate alten Mäusen. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (f/f PV) wurde mit der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante (f/f CKII) verglichen (n = 3). Als Kontrollen wurden konditionale ErbB4 Tiere (f/f) (n = 3) und die „heart rescue“ Nullmutante (hr KO) verwendet. Es wurde eine 180 kDa ErbB4-Bande detektiert, die im Kortex (~50%) und Hippokampus (~60%) der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante reduziert war. In der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante konnte keine sichtbare Reduktion nachgewiesen werden. In der „heart rescue“ Nullmutante wurde die ErbB4-Bande nicht detektiert. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mit Hilfe eines  $\alpha$ -tubulin-spezifischen Antikörpers überprüft. f/f CKII: CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; f/f PV: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; f/f: ErbB4<sup>ff</sup>; hr KO: „heart rescue“ ErbB4 Nullmutante; Hp: Hippokampus; Kx: Kortex (C) Die mRNA-Expression von ErbB2 und ErbB3 ist im Hippokampus der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante (KO) leicht reduziert. Die NRG1-Expression ist hingegen unverändert. KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>; Fehlerbalken: Standardfehler

Die ErbB4-Expression wurde auch auf Proteinebene mit Hilfe von *Western Blots* untersucht. Dabei wurden PV-Interneuron-spezifische und die Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutanten direkt miteinander verglichen. Als Kontrolle wurde die konditionale ErbB4 Mausmutante (ErbB4<sup>ff</sup>) verwendet. Pro Genotyp wurden jeweils drei Tiere im Alter von 3 Monaten analysiert. Es wurden Proteinlysate aus Kortex- und Hippokampus-Gewebe hergestellt und 15 µg in einer SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Analyse der ErbB4-Expression in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) zeigte eine Reduktion um ca. 50% (Hippokampus) bzw. 60% (Kortex). Dagegen war die Expression des Rezeptors in der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) nicht nachweisbar reduziert (Abb.20). Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mit Hilfe eines gegen  $\alpha$ -tubulin gerichteten Antikörpers überprüft. Als zusätzliche Kontrollen wurden die „*heart rescue*“ Nullmutante, in der die 180 kDa Bande von ErbB4 nicht sichtbar war, sowie heterozygote ErbB4 „*knock-out*“ Mäuse verwendet, bei denen eine deutliche Reduktion der ErbB4-Expression beobachtet wurde. Die Analyse wurde zusätzlich auch mit 6 Monate alten Mutanten durchgeführt. Dabei konnte erneut eine Reduktion der ErbB4-Expression in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante nachgewiesen werden, während in der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante eine sehr geringe Reduktion beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Daten unterstützen die Beobachtungen aus Abschnitt 4.4.

Mit Hilfe einer chromogenen ISH sollte die Anzahl ErbB4 positiver Zellen nach Cre-vermittelter Rekombination in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante untersucht werden. Dafür wurden 50 Tage alte Nullmutanten (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) und als Kontrollen konditionale ErbB4 Mausmutanten (ErbB4<sup>ff</sup>) verwendet. Von jeweils drei Tieren pro Genotyp wurden frontale Kryostatschnitte hergestellt. Mit diesen Kryostatschnitten wurde zuerst eine ErbB4-ISH und anschließend eine Immunfärbung für Parvalbumin durchgeführt. Die ErbB4 Sonde wurde, wie im Abschnitt 4.4 beschrieben, ausgehend von dem Plasmid pCDNA3 ErbB4 synthetisiert, das die vollständige kodierende Region der JMa/CYT2-Variante von ErbB4 enthält. Eine Verstärkung des ISH-Signals wurde dabei durch ein modifiziertes Perfusionsprotokoll erreicht. Erstaunlicherweise konnte in der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) nur eine geringe Reduktion der ErbB4-mRNA nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigte die PV-IHC eine starke Überlappung mit dem ISH-Signal in der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) (Abb.21). Die Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination des konditionalen ErbB4-Allels betrifft lediglich das 152 bp große Exon 2. Die verwendete ISH-Sonde wird dagegen ausgehend von dem gesamten ORF hergestellt und zu 200 bp-Fragmenten hydrolysiert. Wird die rekombinante ErbB4 RNA trotz der Deletion vollständig synthetisiert, kann die Sonde an anderen komplementären ErbB4 RNA-Fragmenten binden.



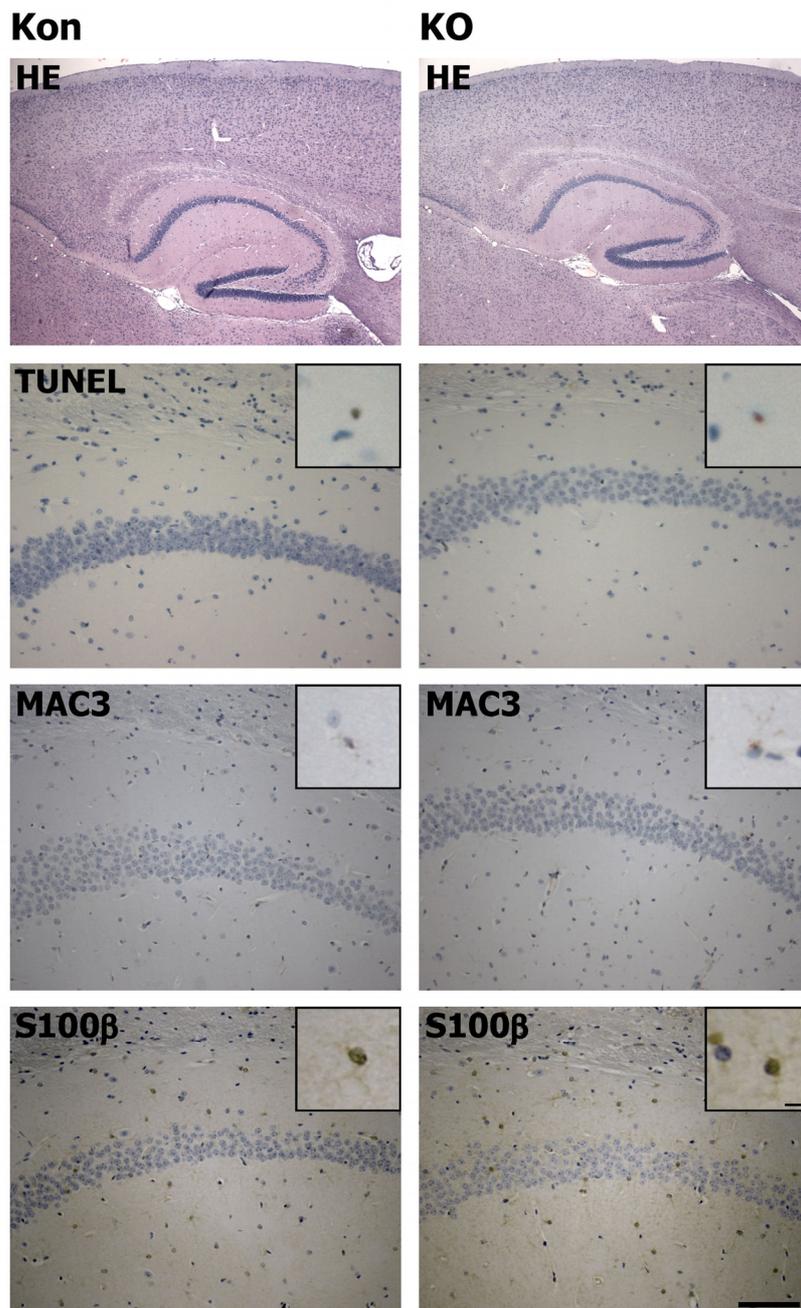
**Abb.21 Histologische Analyse der ErbB4-Expression**

(A) Zelltyp-spezifische Analyse der ErbB4-Expression durch Kombination von chromogener *erbb4* ISH mit fluoreszenter PV-Immunfärbung auf 14 µm dicken, frontalen Kryostatschnitten bei P50. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Kontrolltieren (Kon) verglichen (n = 2). Die ErbB4-mRNA konnte auch in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante in den meisten PV positiven Interneuronen nachgewiesen werden. Die verwendete ISH-Sonde wurde ausgehend vom gesamten ErbB4-ORF hergestellt und in 200 bp große Fragmente hydrolysiert. Dagegen betrifft die Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination nur das 152 bp große Exon 2 des ErbB4-Gens. Wenn die ErbB4-mRNA in der PV-Interneuron-spezifischen Nullmutante synthetisiert wird, kann die ErbB4-Sonde also an komplementäre ErbB4 RNA-Fragmente binden (Gelbe Pfeilspitzen: doppelgefärbte Interneurone; blaue Sternchen: nur ErbB4-RNA exprimierende Zellen). KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>; PV: Parvalbumin (B) Analyse der ErbB4-mRNA-Expression in Zusammenarbeit mit Dr. Cary Lai mit Hilfe radioaktiver ISH. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (f/f PV) wurde mit der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante (f/f CKII) verglichen. Als Kontrollen wurden konditionale ErbB4 Tiere (f/f) verwendet. Die ISH-Sonde wurde ausgehend vom Exon 2 des ErbB4-Gens synthetisiert. In der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante wurde eine deutliche Reduktion des ISH-Signals beobachtet. In der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante war keine Veränderung der ErbB4-Expression nachweisbar (weiße Pfeilspitzen: ErbB4-Signale). f/f CKII: CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; f/f PV: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; f/f: ErbB4<sup>ff</sup>

Um die Reduktion der ErbB4-Expression in beiden ErbB4 Nullmutanten auf ISH-Ebene zu überprüfen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Cary Lai (Department of molecular & integrative Neurosciences, The Scripps Research Institut, La Jolla, CA, USA) eine radioaktive ISH durchgeführt. Als ISH-Sonde wurde diesmal nur das Exon 2 von ErbB4 verwendet. Die ErbB4-Expression wurde zudem nicht nur bei der PV-Interneuron-spezifischen sondern auch bei der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante bei P50 untersucht. Als Kontrolle wurden erneut konditionale ErbB4 Mausmutanten ( $ErbB4^{f/f}$ ) verwendet. Hierbei konnte eine deutliche Reduktion des ISH-Signals bei der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante, nicht jedoch bei der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante nachgewiesen werden (Abb.21). Die Ergebnisse der radioaktiven ISH unterstützen damit die Daten der quantitativen *real time* PCRs und der *Western Blot*-Analyse. Diese Beobachtungen bestätigen also eine prominente Expression des Rezeptors in Interneuronen, während in Pyramidenzellen nur eine geringe Expression nachweisbar ist.

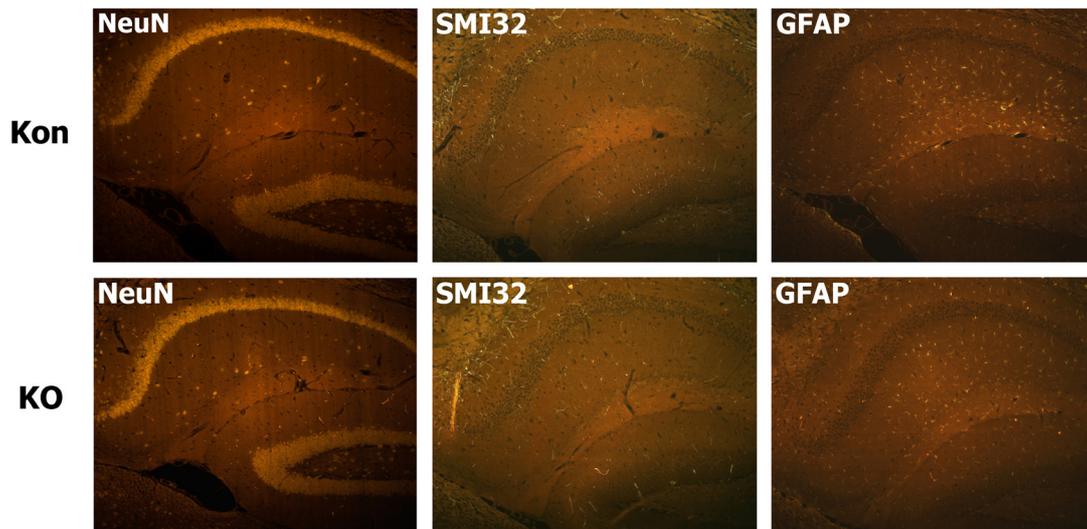
#### **4.7.2 Histologische Analysen der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante**

Zur genaueren morphologischen und histologischen Analyse der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante ( $mPV-Cre^*ErbB4^{f/f}$ ) wurden sagittale Paraffinschnitte von 2 Monate alten Tieren angefertigt. Als Kontrollen wurden homozygote konditionale ErbB4 Mausmutanten verwendet ( $ErbB4^{f/f}$ ). Pro Genotyp wurden 3 Mäuse analysiert. Morphologische Unterschiede sollten mit einer HE-Färbung sichtbar gemacht werden. Es konnte jedoch im Kortex und Hippokampus keine Veränderung in den ErbB4 Nullmutanten ( $mPV-Cre^*ErbB4^{f/f}$ ) festgestellt werden. Wie schon bei den Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutanten wurden verschiedene Marker für Apoptose, Neurodegeneration oder Astrogliose getestet (s. 4.3.1). Die TUNEL-Methode zeigte dabei keine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen (Abb.22). Bei der APP- und der MAC-3-IHC konnten ebenfalls keine Unterschiede festgestellt werden (Abb.22, Daten nicht gezeigt). Die S100 $\beta$ - und GFAP-IHC zeigten keine Aktivierung von Astrozyten (Abb.22 und Abb.23). Auch die NeuN- und SMI32-IHC waren unverändert (Abb.23). Somit konnten also, vergleichbar mit der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mausmutante, keine morphologischen Auffälligkeiten beobachtet werden.



**Abb.22 Immunhistochemische Analyse 2 Monate alter PV-Interneuron-spezifischer ErbB4 Nullmutanten**

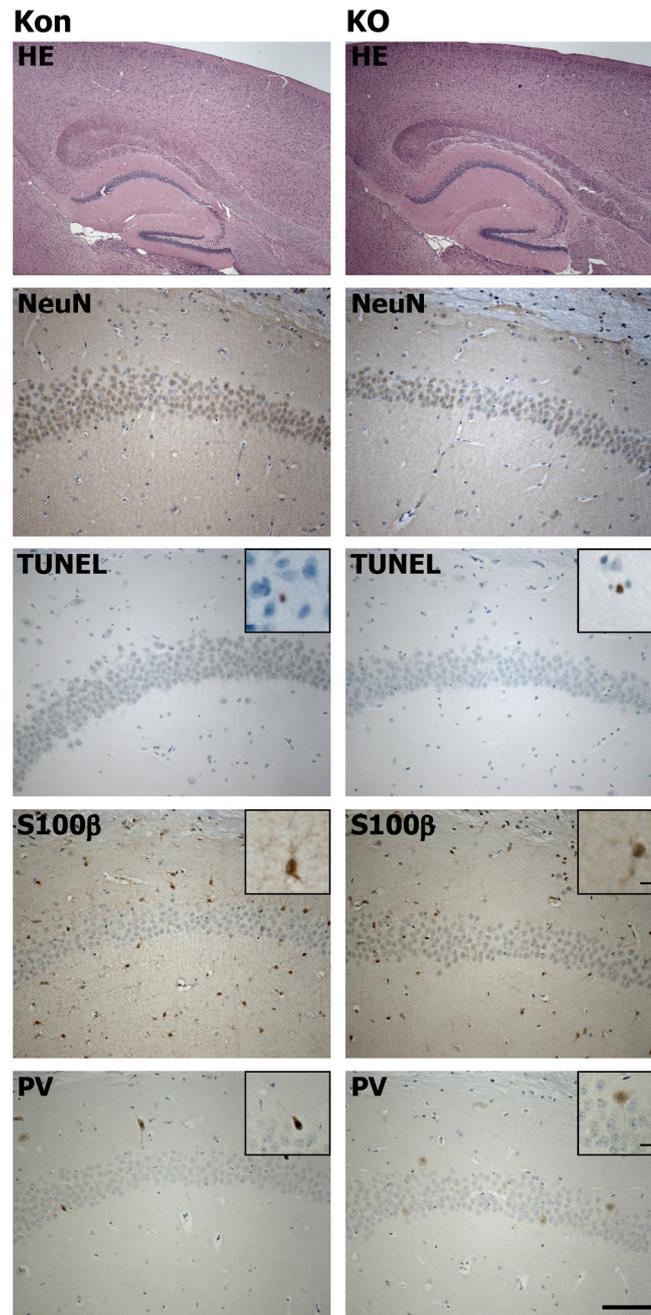
Morphologische und histologische Analysen mit verschiedenen Markern auf 5 µm dicken, sagittalen Paraffinschnitten von 2 Monate alten Mausmutanten. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Mutanten (Kon) verglichen (n = 3). Die HE-Färbung zeigte keine morphologischen Unterschiede im Kortex und Hippokampus. Bei den Immunfärbungen und der TUNEL-Analyse ist die CA1-Region des Hippokampus dargestellt (Maßstabsbalken entspricht 100 µm, gültig für alle CA1-Ausschnitte). Mit der TUNEL-Analyse wurden nur vereinzelt apoptotische Zellen detektiert (siehe Vergrößerung). Es wurde keine Mikroglia-Aktivierung mit der MAC3-Immunfärbung beobachtet, nur einzelne Zellen waren gefärbt (siehe Vergrößerung). Die Anzahl an S100β positiven Astrozyten war unverändert (siehe Vergrößerung; Maßstabsbalken entspricht 10 µm, gültig für alle Vergrößerungen). KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>-/-</sup> Kon: CaMKII-Cre



**Abb.23 Analyse der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante mittels fluoreszenter Immunhistochemie**

Fluoreszente immunhistochemische Analysen mit verschiedenen Markern auf 5  $\mu\text{m}$  dicken, sagittalen Paraffinschnitten von 2 Monate alten Mausmutanten. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Mutanten (Kon) verglichen ( $n = 3$ ). Ausschnitte vom Hippokampus sind dargestellt. Es wurden keine neuronalen Veränderung bei der NeuN- und SMI32-Immunfärbung beobachtet. Die GFAP-Immunfärbung zeigte keine Astrogliose. KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>fl/fl</sup>; Kon: CaMKII-Cre

Es ist möglich, dass sich phänotypische Veränderungen erst mit zunehmendem Alter entwickeln. Aus diesem Grund wurden die ErbB4 Mausmutanten (mPV-Cre\*ErbB4<sup>fl/fl</sup>) erneut in einem Alter von 6 Monaten analysiert. Die HE-Färbung und die immunhistochemischen Färbungen mit den oben genannten Antikörpern waren weiterhin unauffällig (Abb.24). Wie bei der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante wurden PV positiven Interneurone untersucht, wobei ebenfalls keine offensichtlichen Unterschiede in der Verteilung oder bei der Anzahl der Interneurone beobachtet wurden (Abb.24). Somit scheint der postnatale Verlust von ErbB4 in PV positiven Interneuronen auch mit zunehmendem Alter weder Apoptose, Neurodegeneration, Astrogliose noch andere generelle neuronale Veränderungen zu verursachen.

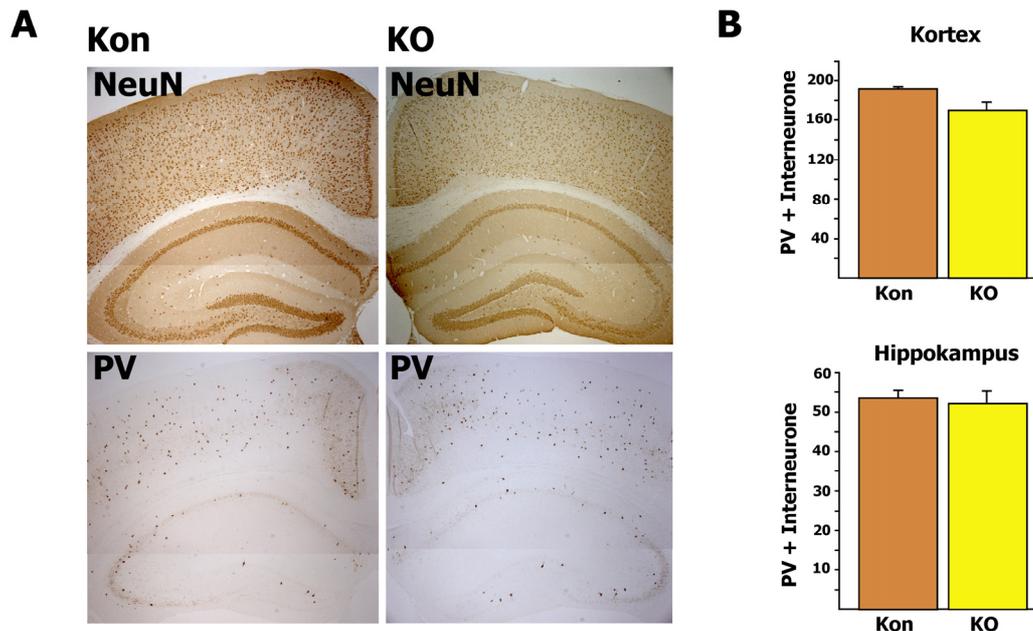


**Abb.24 Immunhistochemische Analyse 6 Monate alter PV-Interneuron-spezifischer ErbB4 Nullmutanten**

Morphologische und histologische Analysen mit verschiedenen Markern auf 5 µm dicken, sagittalen Paraffinschnitten von 6 Monate alten Mausmutanten. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Mutanten (Kon) verglichen (n = 3). Die HE-Färbung zeigte keine morphologischen Unterschiede im Kortex und Hippokampus. Bei den Immunfärbungen und der TUNEL-Analyse ist die CA1-Region des Hippokampus dargestellt (Maßstabsbalken entspricht 100 µm, gültig für alle CA1-Ausschnitte). Die NeuN-Immunfärbung zeigte keine neuronalen Veränderungen. Mit der TUNEL-Analyse wurden nur vereinzelt apoptotische Zellen detektiert (Vergrößerung zeigt Ausschnitt aus dem Kortex). Die Anzahl an S100β positiven Astrozyten war unverändert (siehe Vergrößerung; Maßstabsbalken entspricht 10 µm, gültig für TUNEL und S100β Vergrößerungen) Ebenso wurden bei der PV-Immunfärbung keine Veränderungen bezüglich der Verteilung und Anzahl der Interneurone beobachtet (siehe Vergrößerung; Maßstabsbalken entspricht 20 µm). KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>

### 4.7.3 Analyse der Parvalbumin positiven Interneurone in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Mausmutante

Im medialen und kaudalen Kortex sowie im Hippokampus der adulten „*heart rescue*“ Nullmutante von ErbB4 wurde eine deutlich verminderte Anzahl an GABAergen Interneuronen festgestellt. Diese Reduktion wurde auf einen Migrationsdefekt der Interneurone zurückgeführt, die aus der MGE (*medial ganglion eminence*) in den Kortex wandern [Yau et al. 2003; Flames et al. 2004]. Um zu überprüfen, ob diese Reduktion nur auf einem embryonalen ErbB4-Defekt beruht, wurde in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante die Anzahl der PV positiven Interneurone im Kortex und Hippokampus bestimmt. Es wurden frontale Paraffinschnitte von 3 Monate alten Nullmutanten (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) und homozygoten konditionalen ErbB4 Mausmutanten (ErbB4<sup>ff</sup>) als Kontrollen verwendet. Pro Genotyp wurden drei Tiere analysiert. Mit den Schnitten wurde eine chromogene PV-Immunhistochemie durchgeführt, bei der die Hämatoxylin-Kerngegenfärbung weggelassen wurde (Abb.25). PV positive Interneurone wurden im medialen (Bregma -1,6 mm) und kaudalen (Bregma -2,1 mm) Kortex und Hippokampus gezählt. Die Analyse umfasste die Interneurone des gesamten Hippokampus und des Kortexbereiches oberhalb des Hippokampus, der u. a. den sensorischen und visuellen Kortex beinhaltet. Die Auswertung dieser Färbungen ergaben keine Veränderungen bei der Anzahl der PV positiven Interneurone in beiden Hirnregionen (Abb.25). Zusätzlich wurde eine chromogene NeuN-IHC ohne Hämatoxylin-Kerngegenfärbung durchgeführt, bei der ebenfalls keine Unterschiede erkennbar waren. Die Anzahl der PV positiven Interneurone wird also nicht durch die postnatale Deletion von ErbB4 beeinflusst. Daher scheint die Reduktion der Interneurone in der „*heart rescue*“ Nullmutante vollständig durch den Migrationsdefekt verursacht zu werden.

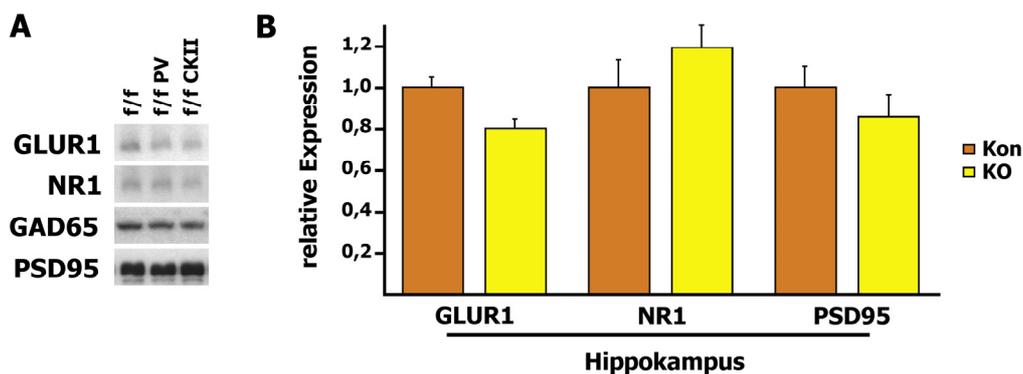


**Abb.25 Unveränderte Anzahl PV positiver Interneurone im Kortex und Hippokampus der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante**

(A) Histologische Analyse der PV positiven Interneurone auf 5 µm dicken, frontalen Paraffinschnitten 3 Monate alter Mäuse. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Mutanten (Kon) verglichen (n = 3). Die NeuN-Immunfärbung zeigte ebenso wie die PV-Immunfärbung keine sichtbaren Unterschiede im kaudalen Kortex und Hippokampus. KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>; PV: Parvalbumin (B) Quantitative Analyse PV positiver Interneurone im kaudalen Kortex und Hippokampus von 3 Monate alten Mäusen. PV-Immunfärbungen wurden auf 5 µm dicken, frontalen Paraffinschnitten durchgeführt (s. A). Die Anzahl der PV positiven Interneurone war weder im kaudalen Kortex noch im Hippokampus verändert. KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>; Kon: ErbB4<sup>ff</sup>; Fehlerbalken: Standardfehler

#### 4.7.4 Expressionsanalysen von Neurotransmitter-Rezeptoren im Kortex und Hippokampus von PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutanten

Wie einige *in vitro* Studien mit z.T. kontroversen Ergebnissen in GABAergen hippocampalen Interneuronen gezeigt haben, wird die Expression und subzelluläre Lokalisation von Neurotransmitter-Rezeptoren durch den Neuregulin-ErbB-Signalweg reguliert (Liu et al., 01; Chang et al., 06). Daher wurde mit Hilfe einer qRT-PCR-Analyse die Expression verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren und synaptischer Proteine untersucht. Hierbei wurde erneut die Kortex- und Hippokampus-cDNA von sechs Nullmutanten (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) und fünf konditionalen ErbB4 Kontrolltieren (ErbB4<sup>ff</sup>), wie unter 4.7.1 beschrieben, verwendet. Interessanterweise wurden keine Veränderungen im Expressionsniveau der GLUR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors und der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors beobachtet. Die Expression von PSD95 war ebenfalls unverändert (Abb.26).



**Abb.26 Unveränderte Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante**

(A) *Western Blot*-Analyse mit Proteinlysaten aus Hippokampus-Gewebe von 6 Monate alten Tieren. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (*f/f PV*) wurde mit der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante (*f/f CKII*) verglichen ( $n = 2$ ). Als Kontrolle wurden konditionale ErbB4 Tiere (*f/f*) verwendet ( $n = 2$ ). Die Expression der GLUR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors und der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, sowie von GAD65 und PSD95 sind in beiden Nullmutanten unverändert. *f/f CKII*: CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>f/f</sup>; *f/f PV*: mPV-Cre\*ErbB4<sup>f/f</sup>; *f/f*: ErbB4<sup>f/f</sup> (B) Quantitative *real time* PCR-Analyse mit cDNA aus Hippokampus-Gewebe von 3 Monate alten Mäusen. Die PV-Interneuron-spezifische ErbB4 Nullmutante (KO) wurde mit konditionalen ErbB4 Kontrolltieren (Kon) verglichen. Für die Analyse wurde jeweils die cDNA von sechs Nullmutanten bzw. von fünf Kontrolltieren zusammengefasst. Es wurden keine Unterschiede bei der Expression der GLUR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors und der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, sowie von PSD95 beobachtet. KO: mPV-Cre\*ErbB4<sup>f/f</sup>; Kon: ErbB4<sup>f/f</sup>; Fehlerbalken: Standardfehler

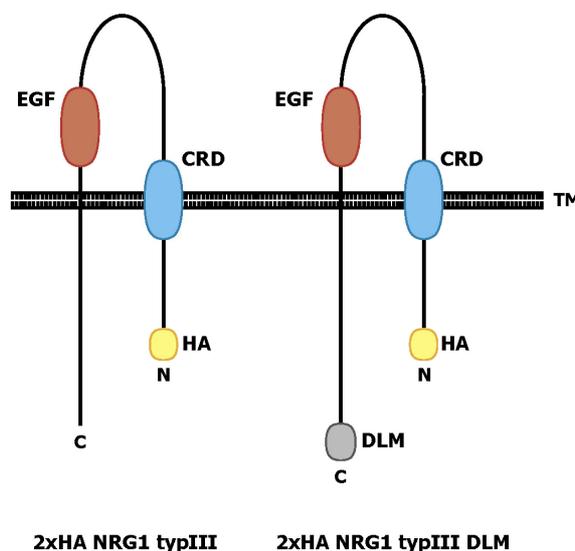
Die Expression einiger Neurotransmitter-Rezeptoren wurde zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Dabei wurden die PV-Interneuron-spezifische und die Pyramidenzell-spezifische ErbB4 Nullmutante direkt miteinander verglichen. Als Kontrolle wurde die konditionale ErbB4 Mausmutante (ErbB4<sup>f/f</sup>) verwendet. Für die Analyse des Proteingehalts wurden 6 Monate alte Tiere verwendet. Dadurch konnte überprüft werden, ob sich der chronische Verlust von ErbB4 zu einem späteren Zeitpunkt auf die Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren auswirkt. Es wurden von zwei Tieren pro Genotyp Proteinlysate aus Kortex- und Hippokampus-Gewebe hergestellt und 20 und 40 µg in einer SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Analyse ergab jedoch keinen Unterschied im Expressionsniveau. So war die Expression der GLUR1-Untereinheiten des AMPA-Rezeptors ebenso wie die Expression der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in beiden Nullmutanten unverändert (Abb.26). Auch bei der PSD95-Expression wurde keine Veränderung beobachtet. Die Expression von GAD65 (Glutamat Decarboxylase), das in Interneuronen den Neurotransmitter GABA aus L-Glutamat synthetisiert, war gleichfalls unverändert (Abb.26).

Im Gegensatz zu den veröffentlichten *in vitro* Studien konnte mit diesen Methoden *in vivo* keine Auswirkung der postnatalen Deletion von ErbB4 in PV positiven Interneuronen oder Pyramidenzellen auf die Expression einer Reihe von Neurotransmitter-Rezeptoren nachgewiesen werden. Da die ErbB4-Expression allerdings nur um maximal 50% reduziert

und lediglich ein geringer Anteil aller kortikalen Neurone betroffen war, können die Veränderungen in der Neurotransmitter-Rezeptor-Expression auch zu gering sein, um mit diesen Methoden detektiert zu werden.

#### 4.8 Expression von HA-markiertem Neuregulin 1 typ III $\beta$ 1a in transgenen Mäusen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte eine transgene Mauslinie hergestellt werden, die Epitop-markiertes Neuregulin 1 typ III  $\beta$ 1a neuronal exprimiert. Die genaue zelltyp-spezifische Expression und subzelluläre Lokalisation der Komponenten des NRG1-ErbB4 Signalwegs sind bislang nicht bekannt. Insbesondere erzeugen die zurzeit vorhandenen Antikörper keine zuverlässigen Daten bei immunhistologischen Analysen. NRG1 spielt im PNS eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Schwann-Zellen und der NMJ (*neuromuscular junction*) [Nave and Salzer 2006]. Die Analyse verschiedener transgener Mauslinien zeigte zudem, dass die Menge an neuronal exprimiertem NRG1 typ III die Dicke der Myelinscheide reguliert [Michailov et al. 2004]. Dabei wurde u. a. eine transgene Mauslinie verwendet, die NRG1 typ III  $\beta$ 1a unter der Kontrolle des Thy1.2 Promotors exprimiert. In dieser Mauslinie kann jedoch auf Proteinebene das endogene NRG1 nicht von dem durch das Transgen exprimierte unterschieden werden.



**Abb.27 Epitop-markierte NRG1 Mausmutanten**

Schematische Darstellung des HA-markierten NRG1-Proteins. Die Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) exprimiert N-terminal mit zwei HA-Epitopen markiertes NRG1 typIII  $\beta$ 1a unter Kontrolle des Thy1.2 Promotors. In der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM) enthält das HA-markierte NRG1-Transgen zusätzlich noch ein DLM am C-Terminus. CRD: Cystein-reiche Domäne; DLM: dendritisches Lokalisierungsmotiv; EGF: Epidermiswachstumsfaktor (*epidermal growth factor*); TM: Zellmembran

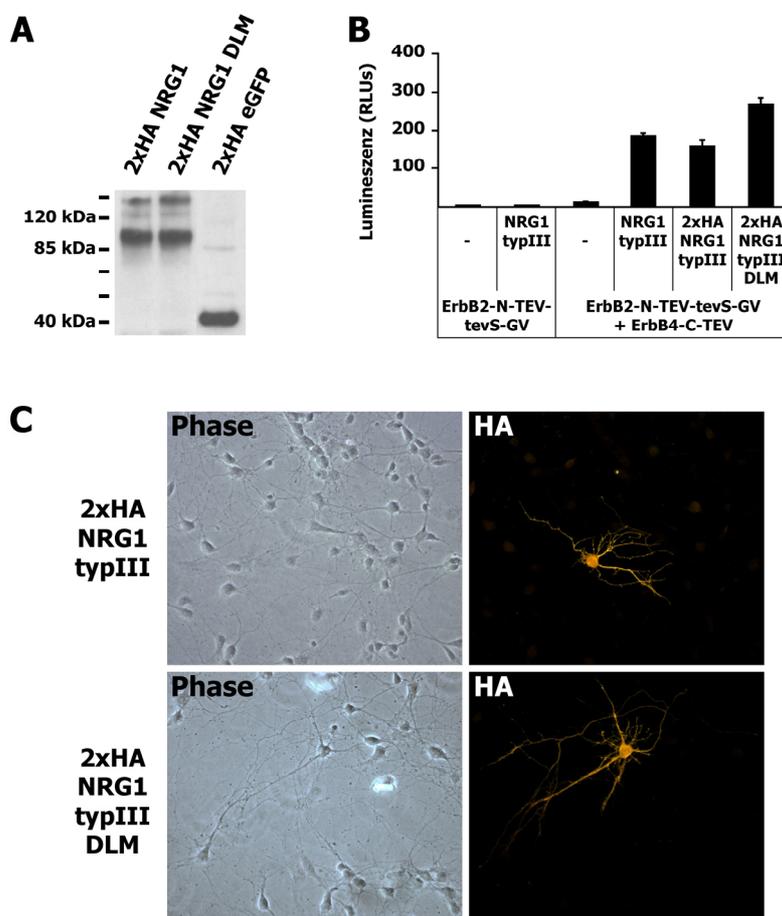
Die Epitop-Markierung von NRG1 typ III  $\beta$ 1a sollte die Analyse der subzellulären Lokalisation des Wachstumsfaktors ermöglichen. Für eine immunreaktive Markierung ist das nur 9 Aminosäuren große Hemagglutinin (HA)-Epitop aus dem Influenza Virus A besonders gut geeignet [Field et al. 1988]. Daher wurde das HA-Epitop bei der Herstellung von zwei verschiedenen transgenen Mauslinien zur N-terminalen Markierung von NRG 1 typ III  $\beta$ 1a verwendet.

#### 4.8.1 Herstellung der transgenen Mauslinien (Thy1.2-2xHA NRG1typIII)

Zur Herstellung der transgenen Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) wurde eine Fusion von zwei HA-Epitopen an den N-Terminus von NRG1 typ III  $\beta$ 1a durchgeführt (Abb. 27). Das Plasmid pCMV2-NRG1typIII wurde als Ausgangskonstrukt verwendet und die HA-Epitope sowie die für die Klonierung nötigen Restriktionsschnittstellen mittels PCR angefügt. Im ersten PCR-Schritt wurde mit einem 65 bp langen *sense* Primer die Sequenzen des ersten und Teile des 2ten HA-Epitops an den N-Terminus der kodierenden Sequenz von NRG1 typ III angefügt. Anschließend wurde das Produkt der ersten PCR-Reaktion in einer zweiten PCR verwendet. Der 62 bp lange *sense* Primer fügte dabei das restliche HA-Epitop sowie eine Kozak Sequenz und die Restriktionsschnittstellen für EcoRI, XbaI und Sal I an. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, in pGEM-T kloniert und anschließend sequenziert. Durch EcoRI/BamHI-Verdau wurde das modifizierte N-terminale Fragment aus dem pGEM-T Plasmid herausgeschnitten und in das Plasmid pCMV2-NRG1typIII ligiert.

Die Funktionalität des Konstrukts pCMV2-2xHANRG1typIII wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Dafür wurden zunächst COS7 Zellen mit dem Plasmid elektroporiert und anschließend Proteinlysate hergestellt. *Western Blot*-Analysen zeigten eine prominente Expression von 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Plasmid pHAHA EGFP hergestellt, das HA-markiertes eGFP unter einem CMV-Promotor exprimiert (Abb.28). Die subzelluläre Lokalisation von 2xHA-NRG1 typIII  $\beta$ 1a sollte ebenfalls *in vitro* untersucht werden. Das Konstrukt pCMV2-2xHANRG1typIII wurde dazu in primäre hippocampale Neurone transfiziert und anschließend eine Immunfärbung mit einem gegen die HA-Epitope gerichteten Antikörper durchgeführt. 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a wurde dabei nicht nur membranständig sondern auch im Soma der ganzen Zelle, sowie in allen Neuriten detektiert (Abb.28). Der CMV-Promotor verursachte vermutlich eine starke Expression des Transgens, so dass keine spezifische Lokalisierung möglich war. Das Epitop-markierte Neuregulin wurde zusätzlich in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Wehr (Abteilung Neurogenetik, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) mit Hilfe des *split-TEV assay* [Wehr et al. 2006] auf die Fähigkeit getestet, *in vitro* an ErbB4 zu binden und die Heterodimerisierung mit ErbB2 zu initialisieren. Dabei bindet und dimerisiert das mit HA-markierte NRG1 die Rezeptoren genauso effektiv wie das nicht markierte NRG1 (Abb.28). Die Epitop-Markierung hat also keinen negativen Einfluss auf die Aktivierung der

Rezeptoren. Durch die Markierung von NRG1 typ III  $\beta$ 1a mit HA-Epitopen ergibt sich somit eine ideale Möglichkeit, um die Lokalisation und das Prozessieren von NRG1 im Nervensystem transgener Mäuse zu analysieren.



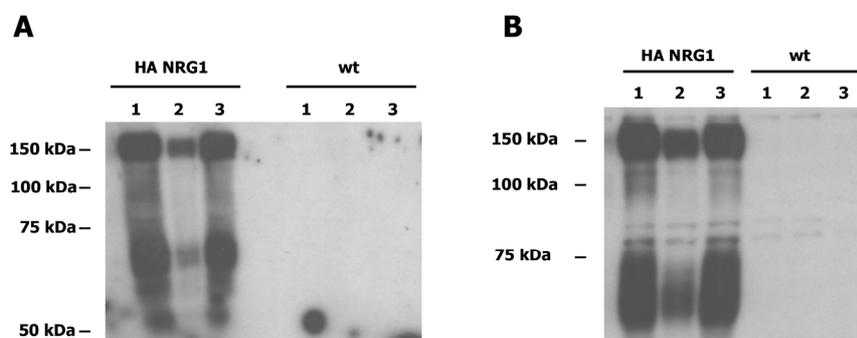
**Abb.28 Funktionalität der Epitop-markierten NRG1 typ III-Varianten**

(A) *Western Blot*-Analyse der Epitop-markierten NRG1 typ III-Konstrukte. Die Plasmide pCMV2-2xHANRG1typIII und pCMV2-2xHANRG1typIIIDLM wurden in COS7-Zellen elektroporiert und anschließend Proteinlysate hergestellt. Bei beiden Konstrukten konnte eine ~110 kDa Bande mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert werden. Als Kontrollplasmid wurde pCMV2-2xHAeGFP verwendet. (B) Um zu überprüfen, ob die Epitop-markierten NRG1 typ III-Varianten ErbB4 binden und eine Heterodimerisierung mit ErbB2 initialisieren können wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Wehr ein *split-TEV assay* durchgeführt (Wehr et al., 06). Beide NRG1 typIII-Varianten können unabhängig von den N- und C-terminalen Epitopen die Heterodimerisierung ebenso effizient wie das nicht-markierte NRG1 typ III hervorrufen. (C) Analyse der subzellulären Lokalisation der Epitop-markierten NRG1 typ III-Varianten. Die Plasmide pCMV2-2xHANRG1typIII und pCMV2-2xHANRG1typIIIDLM wurden in Hippokampus-Primärkulturen transfiziert und nach 6-8h eine HA-Immunfärbung durchgeführt. Beide Epitop-markierten NRG1 typ III-Varianten konnten nicht nur membranständig, sondern auch im Soma und den Neuriten detektiert werden. Die pCMV2-getriebene Expression ist zu stark, um eine subzelluläre Lokalisation der Epitop-markierten NRG1 typ III-Transgene zu ermöglichen. DLM: dendritisches Lokalisierungs-Motiv;

Zur Herstellung der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) wurde aus dem Plasmid pCMV2-2xHANRG1typIII mit einem Sal I-Restriktionsverdau 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a herausgeschnitten und in den mit XhoI geöffneten Thy1.2 Vektor kloniert. Anschließend wurden mit einem PvuI-Restriktionsverdau Teile der Vektorsequenzen entfernt und das resultierende DNA-Fragment für die Pronukleusinjektion verwendet. In 6 der 16 geborenen F<sub>0</sub>-Nachkommen konnte das Transgen mit einer PCR nachgewiesen werden. Allerdings wurde nur bei zwei dieser transgenen Mäuse die Expression von 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a auf Proteinebene im Gehirn nachgewiesen. Ausgehend von diesen Tieren wurden zwei Mauslinien gezüchtet. Die hier gezeigten Daten stammen jedoch nur von der Linie A (HANI), die das Transgen deutlich prominenter exprimiert.

#### 4.8.2 Charakterisierung der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII)

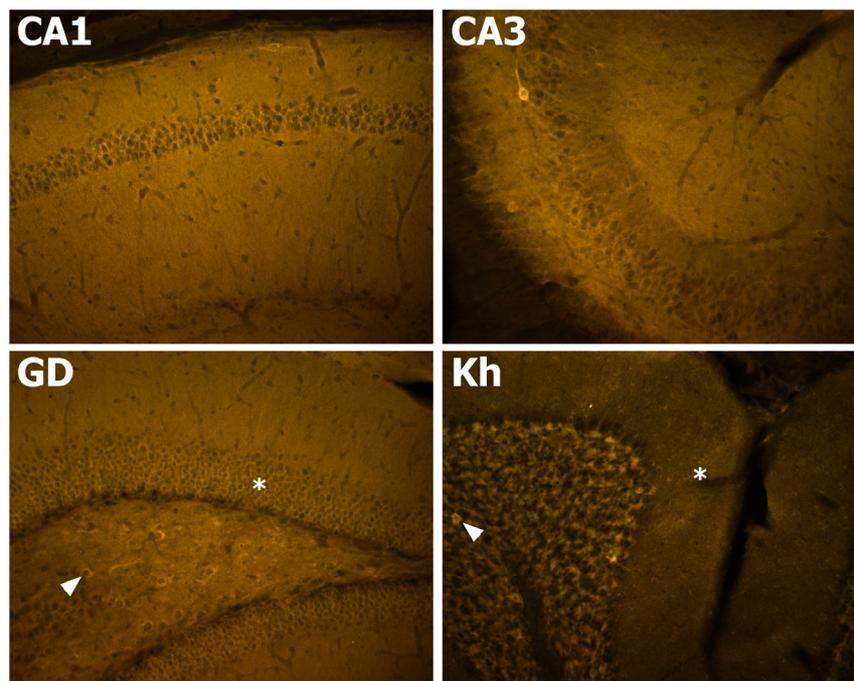
Die Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) wurde auf den C57Bl6N-Hintergrund zurückgekreuzt. Dabei war die Geburtenrate und Wurfgröße normal. Die Verteilung der Genotypen entsprach Mendel und transgene Tiere wiesen eine normale Lebenserwartung auf.



**Abb.29 Prominente Überexpression des HA-markierten NRG1 typ III in der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII)**

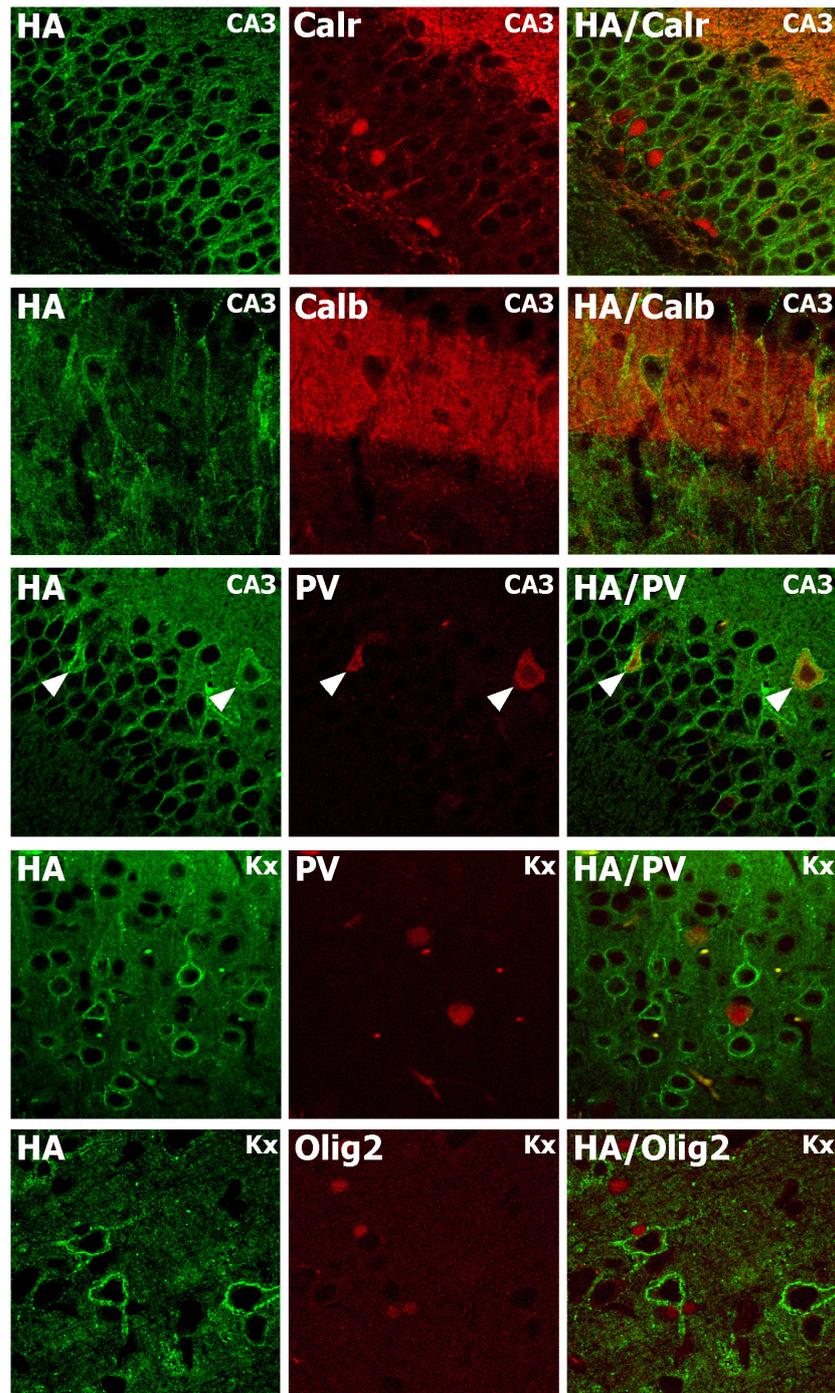
*Western Blot*-Analyse mit Proteinlysaten aus Hippokampus-Gewebe von 6 Monate alten Tieren. Die Expression von 2xHA-NRG1 typIII  $\beta$ 1a in transgenen Tieren der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) wurden mit der NRG1 typIII  $\beta$ 1a-Expression in Wildtyp Mäusen verglichen (n = 3). **(A)** Mit einem HA-spezifischen Antikörper wurde eine prominente Expression von 2xHA-NRG1 typIII  $\beta$ 1a in transgenen Tieren beobachtet. **(B)** *Western Blot* mit einem gegen den C-Terminus von NRG1 typIII  $\beta$ 1a gerichteten Antikörper. Die Expression des NRG1-Transgens ist deutlich stärker, so dass bei normalen Expositionszeiten das endogene NRG1 typIII  $\beta$ 1a nicht nachweisbar ist. HA NRG1: 2xHA-NRG1 typIII  $\beta$ 1a; wt: Wildtyp

Mit einer *Western Blot*-Analyse wurde die Expression von 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a *in vivo* untersucht. Aus Hippokampus- und Kortex-Gewebe von 6 Monate alten Tieren wurden Proteinlysate hergestellt. Dafür wurden drei transgene Mäuse der Linie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) und als Kontrollen drei Wildtyp Mäuse verwendet. Mit einem gegen die HA-Epitope gerichteten Antikörper konnte eine prominente Expression des Transgens nachgewiesen werden (Abb.29, Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den C-Terminus von NRG1 typ III  $\beta$ 1a gerichtet ist. Damit konnte die endogene Expression von NRG1 mit der des Transgens verglichen werden. Im Vergleich zur endogenen NRG1-Expression wird das NRG1-Transgen deutlich stärker exprimiert, so dass bei normalen Expositionszeiten das endogene NRG1 nicht nachweisbar war (Abb.29, Daten nicht gezeigt).



**Abb.30 Expressionsmuster des HA-markierten NRG1 typ III in der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII)**

Analyse der 2xHA-NRG1 typIII  $\beta$ 1a-Expression auf 30  $\mu$ m dicken, sagittalen Vibratomschnitten eines 2 Monate alten Tieres der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII). Mit Hilfe einer HA-Immunfärbung wurde eine prominente Expression in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus, sowie in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus (GD: Sternchen) und den Hilusneuronen (GD: weiße Pfeilspitze) nachgewiesen. Im Kleinhirn exprimierten einige Interneurone in der Molekularschicht (Kh: Sternchen) sowie vereinzelt Purkinjezellen und Golgi-Zellen (Kh: weiße Pfeilspitze) das NRG1-Transgen.



### Abb.31 Zelltyp-spezifische Analyse der 2xHA-NRG1 typIII $\beta$ 1a-Expression

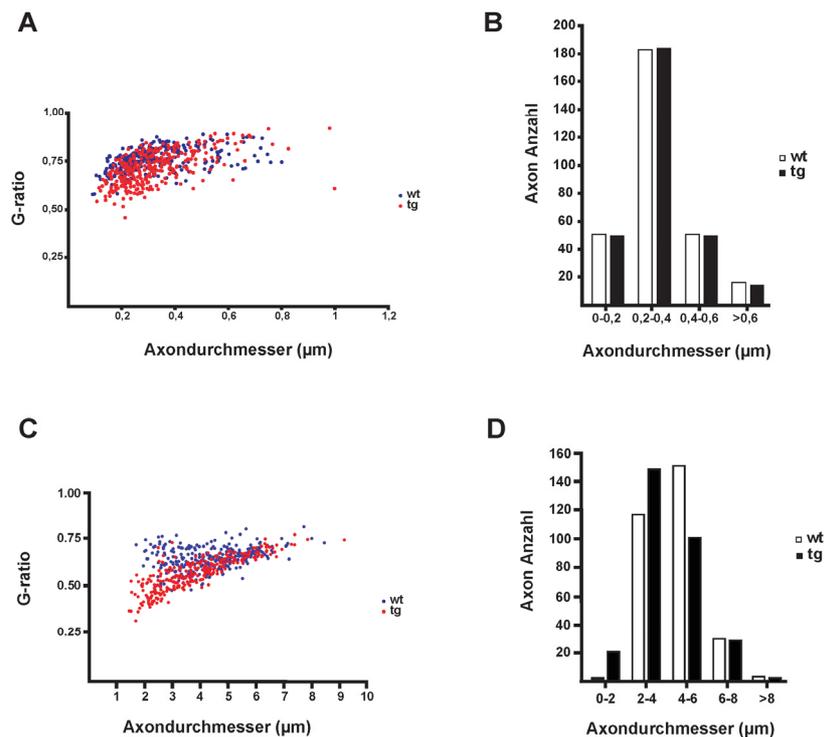
Doppel-Immunfärbungen auf 10  $\mu$ m dicken, sagittalen Paraffinschnitten 2 Monate alter Tiere der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII). Es wurde keine Kolokalisation von 2xHA-NRG1 typIII  $\beta$ 1a und Calretinin im *stratum pyramidale* der CA3-Region des Hippokampus beobachtet. Ebenso wurde das NRG1-Transgen nicht in Calbindin exprimierenden Interneuronen im *stratum lucidum* der CA3-Region des Hippokampus detektiert. Dagegen wurde 2xHA-NRG1 typIII  $\beta$ 1a in einigen PV positiven Interneuronen der CA3-Region nachgewiesen (weiße Pfeilspitzen). Im Kortex wurde seltener eine Kolokalisation des NRG1-Transgens mit PV positiven Interneuronen beobachtet. Es wurden im Kortex keine Expression des NRG1-Transgens in Olig2 exprimierenden Oligodendrozyten detektiert. Calb: Calbindin; Calr: Calretinin; PV: Parvalbumin

#### 4.8.2.1 Histologische Analysen der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII)

Durch Immunfärbungen wurde zunächst das generelle Expressionsmuster des NRG1-Transgens untersucht. Dafür wurden sagittale Vibratomschnitte von einem 2 Monate alten Tier der F1-Generation verwendet. Die Immunfärbung mit einem gegen die HA-Epitope gerichteten Antikörper zeigte eine deutliche Färbung in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus sowie in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus und in Hilusneuronen (Abb.30). Im Kortex wird das Transgen in den Schichten II-III, V und VI exprimiert (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte das Transgen in einigen Interneuronen der Molekularschicht des Kleinhirns und sehr selten in einzelnen Purkinjezellen sowie Golgi-Zellen detektiert werden (Abb.31). Eine genauere Expressionsanalyse wurde mit sagittalen Paraffinschnitten von 2 Monate alten Tieren durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe verschiedener Doppelfärbungen untersucht, in welchen Zelltypen das Transgen exprimiert wird. Der Thy1.2 Promotor ist im ZNS u. a. in Neuronen des Kortex und Hippokampus aktiv. Die Expression variiert dabei stark in verschiedenen transgenen Mauslinien [Caroni 1997]. Mit einigen interneuronalen Markern wurde daher untersucht, ob 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a auch in Interneuronen des Kortex und Hippokampus exprimiert wird. Es wurde kein IHC-Signal in Calretinin oder Calbindin exprimierenden Interneuronen detektiert (Abb.31). Dagegen wurden vor allem im Hippokampus einige PV positive Interneurone nachgewiesen, die das Transgen exprimierten. Im Kortex ist diese Koexpression seltener (Abb.31). In Astrozyten und Oligodendrozyten wurde das Transgen nicht nachgewiesen. Generell zeigte die Immunfärbung eine membranständige Lokalisation des Transgens, wobei die Zellmembran des Somas am stärksten gefärbt war (Abb.31).

#### 4.8.2.2 PNS & ZNS Myelinisierung in der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII)

Bei einer ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe hergestellten Mauslinie, die NRG1 typIII  $\beta$ 1a unter der Kontrolle des Thy1.2 Promotors exprimiert, wurde eine Hypermyelinisierung des PNS festgestellt [Michailov et al. 2004]. Erst kürzlich wurde in dieser Mauslinie auch eine Hypermyelinisierung im ZNS nachgewiesen [Brinkmann et al. 2008]. Daher wurde untersucht, ob auch in der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) eine Hypermyelinisierung des ZNS und PNS vorliegt. Mit einer *G-ratio*-Analyse wurde die Myelin-Schichtdicke bestimmt. Hierbei wird der Durchmesser des Axons mit dem des myelinisierten Axons ins Verhältnis gesetzt. Unabhängig von der Größe des Axons wird dabei ein Wert von etwa 0,7 erhalten. Es wurden Semidünn-Schnitte von 3 Monate alten transgenen Mäusen und Wildtypmäusen zur Analyse verwendet.



**Abb.32 Hypermyelinisierung im ZNS und PNS der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII)**

(A, B) *G-ratio*-Analyse der Myelindicke und Größenverteilung der Axone im Corpus Callosum 3 Monate alter Tiere der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII). Als Kontrollen wurden Wildtyp Mäuse (wt) verwendet. Pro Genotyp wurden 3 Tiere untersucht. (A) Das *G-ratio* wurde gegen den Axondurchmesser aufgetragen. Eine signifikante Hypermyelinisierung wurde vor allem bei kleineren Axonen der transgenen Mäuse (tg) beobachtet. (B) Die Anzahl der Axone wurde gegen den Axondurchmesser aufgetragen. Die Verteilung der Axone ist in transgenen Mäusen (tg) unverändert. (C, D) *G-ratio*-Analyse der Myelindicke und Größenverteilung der Axone im Ischiasnerv 3 Monate alter Tiere der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII). Als Kontrollen wurden Wildtyp Mäuse (wt) verwendet. Pro Genotyp wurden 3 Tiere untersucht. (C) Das *G-ratio* wurde gegen den Axondurchmesser aufgetragen. Eine signifikante Hypermyelinisierung wurde vor allem bei kleineren Axonen der transgenen Mäuse (tg) beobachtet. (D) Die Anzahl der Axone wurde gegen den Axondurchmesser aufgetragen. Die Verteilung der Axone ist größtenteils unverändert, wobei eine Tendenz zu einer etwas erhöhten Anzahl von kleinen myelinisierten Axonen ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ) beobachtet wurde. wt: Wildtyp; tg: Thy1.2-2xHA NRG1typIII

Die *G-ratio*-Analyse im Corpus Callosum zeigte eine signifikante Hypermyelinisierung, vor allem bei kleineren Axonen (Abb.32). Analysen des Axon-Durchmessers ergaben keine Veränderung in der Verteilung der Axongröße (Abb.32). Im PNS der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) konnte ebenfalls eine Hypermyelinisierung der Axone nachgewiesen werden, wobei wiederum die kleineren Axone stärker betroffen waren (Abb.32). Die Größenverteilung der Axone ist im PNS größtenteils unverändert, allerdings wurde eine Tendenz zu einer leicht erhöhten Anzahl von kleinen myelinisierten Axonen ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ) beobachtet (Abb.32). Diese Daten sind vergleichbar mit den Beobachtungen in der „ursprünglich“ überexprimierenden Maus [Michailov et al. 2004]. Damit bestätigten sowohl

der *split-TEV assay in vitro* als auch die *G-ratio-Analyse in vivo*, dass die N-terminale Epitop-Markierung von NRG1 typIII  $\beta$ 1a keinen Einfluss auf die Funktion des Wachstumsfaktors hat. Mit Hilfe der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) soll in Zukunft die subzelluläre Lokalisation und die proteolytische Prozessierung des NRG1-Transgens untersucht werden. Dazu sollen biochemische Analysen (*Western Blot*, Immunopräzipitation) von Synaptosomen Präparationen und histologische Untersuchungen durchgeführt werden.

#### 4.8.3 Herstellung der transgenen Mauslinien (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM)

NRG1 wird hauptsächlich in Axonen und Synapsen exprimiert, wobei die Datenlage bezüglich der Expression im Soma und Dendriten nicht eindeutig ist [Loeb et al. 1999; Longart et al. 2004]. Die axonale Expression von NRG1 typIII  $\beta$ 1a hat einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Myelinscheide sowie auf die Myelin-Schichtdicke [Michailov et al. 2004; Taveggia et al. 2005]. Dendriten sind dagegen nicht von einer Myelinscheide umgeben. Sogar *in vitro* myelinisieren Oligodendrozyten ausschließlich Axone [Lubetzki et al. 1993]. Um zu überprüfen, ob eine dendritische Expression von NRG1 typIII  $\beta$ 1a eine Myelinisierung von Dendriten induzieren kann, wurde eine Mauslinie hergestellt, die zusätzlich zu den N-terminalen HA-Epitopen ein Motiv für dendritische Lokalisierung (DLM) am C-Terminus enthält (Abb.27). Dieses 16 Aminosäuren große Peptid ist ursprünglich im C-Terminus von Kalium-Kanälen der *Shal*-Familie enthalten. Die C-terminale Fusion des DLM bewirkt eine dendritische Lokalisation von normalerweise axonal oder unspezifisch lokalisierten membranständigen Proteinen [Rivera et al. 2003]. Kann die dendritische Expression von NRG1 typ III  $\beta$ 1a *in vivo* die Myelinisierung von Dendriten induzieren?

Die N-terminale Markierung von NRG1 typ III  $\beta$ 1a mit zwei HA-Epitopen erfolgte wie bei der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII) (s. 4.8.1). Das DLM wurde mit einer PCR an den C-Terminus von NRG1 typ III  $\beta$ 1a angefügt. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Über einen BstX I-NotI-Restriktionsverdau wurde das modifizierte C-terminale Fragment in das Plasmid pCMV2-NRG1typIII kloniert. Dann folgte die Klonierung des mit zwei HA-Epitopen modifizierten N-terminalen Fragments über einen EcoRI/BamHI-Restriktionsverdau in das Plasmid pCMV2-NRG1typIIIDLM, woraus das Plasmid pCMV2-2xHANRG1typIIIDLM resultierte.

Mit verschiedenen Methoden wurde die Funktionalität des Konstrukts *in vitro* untersucht. Ein *Western Blot* mit Proteinlysaten von transfizierten COS7 Zellen zeigte mit einem gegen die HA-Epitope gerichteten Antikörper die Expression von 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a-DLM (Abb.28). Zur Analyse der subzellulären Lokalisation wurde das Plasmid in primäre hippocampale Neurone transfiziert. Das Transgen wurde mit einer HA-Immunfärbung nicht nur membranständig sondern auch im gesamten Soma der Zelle und in den Neuriten nachgewiesen (Abb.28). Die Analyse der Transgen-Expression erfolgte bereits 6-8h nach der Transfektion der Neurone. Dennoch war bereits zu diesem Zeitpunkt die Expression so

stark, dass eine Aussage über eine differentielle subzelluläre Lokalisation nicht möglich war. In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Wehr (Abteilung Neurogenetik, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) wurde auch dieses Konstrukt mit Hilfe des *split-TEV assay* untersucht [Wehr et al. 2006]. Diese Analyse ergab, dass das N- und C-terminal modifizierte NRG1 die Heterodimerisierung von ErbB-Rezeptoren ebenso gut wie die nicht markierte Kontrolle stimuliert (Abb.28).

Zur Herstellung der transgenen Mäuse wurde 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a-DLM mit einem Sal I-Verdau aus dem Plasmid pCMV2-2xHANRG1typIIIDLM herausgeschnitten und in den mit XhoI geöffneten Thy1.2 Vektor kloniert. Anschließend wurden mit einem PvuI-Restriktionsverdau Teile der Vektorsequenzen entfernt und das entstehende DNA-Fragment für die Pronukleusinjektion verwendet. Mit einer PCR konnte in genomischer DNA aus Schwanzbiopsiematerial in 3 der 15 geborenen Mäuse das Transgen nachgewiesen werden, wobei Nachkommen von nur einer dieser transgenen Mäuse das Protein im Gehirn exprimierten. Ausgehend von diesem Tier wurde die Mauslinie HNID gezüchtet.

#### **4.8.4 Charakterisierung der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM)**

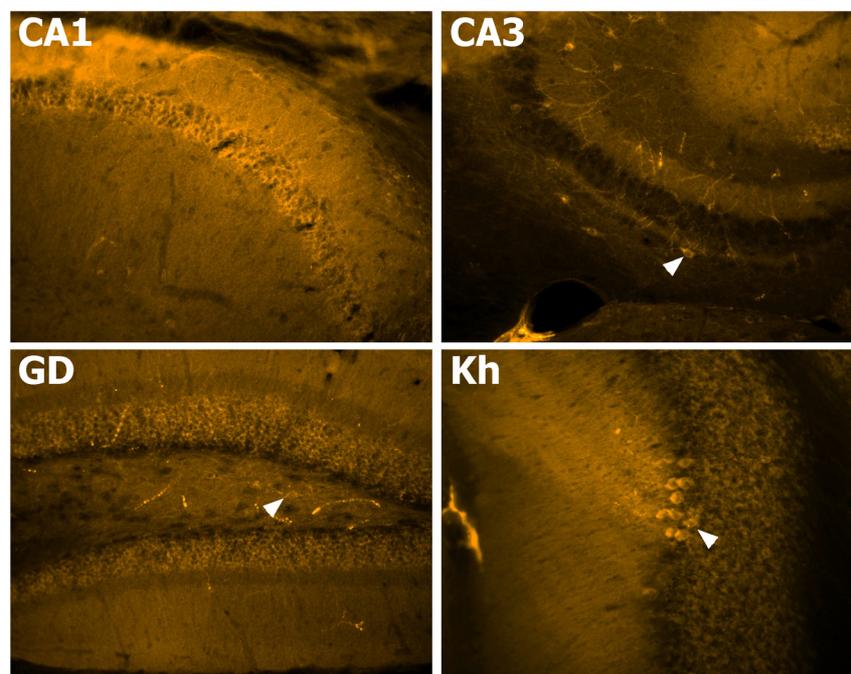
Die Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM) wurde auf einen C57Bl6N-Hintergrund zurückgekreuzt. Dabei wurde zu Beginn eine normale Geburtenrate und Wurfgröße beobachtet. Ab der Generation F7 wurden allerdings weniger als 50% transgene Mäuse geboren. Außerdem nahm die Wurfgröße ab und einige transgene Mäuse starben frühzeitig. Der Grund für diese phänotypische Veränderung ist zurzeit noch unbekannt.

##### **4.8.4.1 Histologische Analysen der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM)**

Das Expressionsmuster der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM) wurde mit einer fluoreszenten Immunfärbung auf sagittalen Vibratomschnitten eines 6 Wochen alten Tieres der F1-Generation untersucht. Im Kortex wurde die Expression des Transgens in den Schichten II-III, sowie V und VI nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die CA1-Region des Hippokampus und die Körnerzellen des Gyrus Dentatus sowie Hilusneurone waren ebenfalls positiv (Abb.33). In der CA3-Region des Hippokampus exprimierten dagegen nur einzelne Zellen das Transgen. Im Kleinhirn wurde 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a-DLM in einzelnen Gruppen von Purkinjezellen detektiert (Abb.33). Gerade der Dendritenbaum der Purkinjezellen eignet sich zur Untersuchung einer NRG1-induzierten Myelinisierung von Dendriten. So wurde z.B. eine partielle Myelinisierung der Purkinjezell-Dendriten nach der Durchtrennung der Kletterfasern (*climbing fibers*) nachgewiesen [Hamori et al. 1980]. Bei der Analyse 2 Monate alter transgener Mäusen wurde allerdings beobachtet, dass das HA-IHC Signal im Vergleich zur Mauslinie (Thy1.2-2xHANRG1typIII) weniger deutlich membranständig war, sondern eher

eine vesikuläre Lokalisation innerhalb des Zytoplasmas aufwies. Zudem wurde nur eine schwache Expression des Transgens in den Dendriten der Purkinjezellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Als Marker für kompaktes Myelin wurde MPB (*myelin basic proteins*) verwendet. Die HA/MBP-Doppelfärbung zeigte in den transgenen Mäusen keine Myelinisierung der Purkinjezell-Dendriten in der Molekularschicht des Kleinhirns transgener Mäuse. Die Daten deuten darauf hin, dass eine dendritische Expression von NRG1 keine Myelinisierung von Dendriten induzieren kann. Allerdings kann auch ein Transportdefekt des NRG1-Transgens nicht ausgeschlossen werden.



**Abb.33 Expressionsmuster des HA-markierten NRG1 typIII in der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM)**

Analyse der 2xHA-NRG1 typ III  $\beta$ 1a-DLM-Expression auf 30  $\mu$ m dicken, sagittalen Vibratomschnitten eines 6 Wochen alten Tieres der Mauslinie (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM). Mit Hilfe einer HA-Immunfärbung wurde eine prominente Expression in der CA1-Region des Hippokampus, sowie in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus und den Hilusneuronen (GD: weiße Pfeilspitze) nachgewiesen. In der CA3-Region des Hippokampus beschränkte sich die Expression des NRG1-Transgens auf einzelne Zellen (CA3: weiße Pfeilspitze). Im Kleinhirn exprimierten einzelne Gruppen von Purkinjezellen (Kh: weiße Pfeilspitze) das NRG1-Transgen.

## 5 DISKUSSION

Der Neuregulin-ErbB4-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Entwicklungsprozesse (z.B. bei der Herzentwicklung, neuralen Migration, Differenzierung und axonalen Wegfindung) [Gassmann et al. 1995; Anton et al. 2004; Flames et al. 2004; Lopez-Bendito et al. 2006]. Zudem stellen Varianten der Neuregulin 1- (NRG1) und ErbB4-Gene potentielle Risikofaktoren für Schizophrenie dar [Harrison and Weinberger 2005; Silberberg et al. 2006]. ErbB4 wird bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung im rostralen ZNS, im Stammhirn (Rhombomere 3 und 5) sowie im Herzen exprimiert [Gassmann et al. 1995; Tidcombe et al. 2003]. Die Expression des Rezeptors bleibt postnatal in einigen Gehirnregionen erhalten. Die Funktion von ErbB4 im adulten Gehirn und die zelltyp-spezifische Expression ist jedoch noch nicht genau bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die ErbB4-Expression im adulten Gehirn analysiert. Zudem wurden konditionale ErbB4 Nullmutanten verwendet, um die postnatale Funktion des Rezeptors in Pyramidenzellen und in Parvalbumin (PV) positiven Interneuronen *in vivo* zu untersuchen.

### 5.1 ErbB4 wird überwiegend in GABAergen Interneuronen exprimiert

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob ErbB4 eine Rolle in Pyramidenzellen spielt [Gerecke et al. 2001; Yau et al. 2003]. So zeigte eine *in vitro* Studie, dass die Stimulation von Pyramidenzellen mit der EGF- $\beta$ -Domäne von Neuregulin 1 (NRG1) im präfrontalen Kortex von Ratten zu einer Reduktion der NMDA-Rezeptor vermittelten Ströme führt. Die NRG1-vermittelte Verringerung von NMDA-Rezeptor-Strömen erfolgte dabei vermutlich durch eine Aktin-abhängige Rezeptorinternalisierung [Gu et al. 2005]. Ebenso konnte *in vitro* eine Regulation der ErbB4-Aktivität durch PSD95 nachgewiesen werden [Huang et al. 2000]. Dabei wird wahrscheinlich durch die Bildung eines ternären Komplexes eine Verstärkung des NRG1-Signals bewirkt. Auch aktuelle *in vitro* Studien belegen eine Funktion von ErbB4 in Pyramidenzellen [Li et al. 2007]. Allgemein anerkannt ist die Expression des Rezeptors in GABAergen Interneuronen [Yau et al. 2003; Flames et al. 2004]. Eine besondere Rolle spielt der NRG1-ErbB4-Signalweg bei der Migration von Interneuronen aus dem Subpallium in den Kortex. So führt die embryonale Deletion von ErbB4 in diesen Interneuronen zu einem Migrationsdefekt und zu einer verringerten Anzahl GABAerger Interneuronen im adulten Gehirn [Flames et al. 2004]. Der Rezeptor besitzt ebenso eine Funktion bei der Migration von neuralen Vorläuferzellen im rostralen Migrationsstrom (RMS) [Anton et al. 2004]. Zudem wurde in der PSD (*postsynaptic density*) hippocampaler Neuronen eine partielle Kolokalisation von ErbB4 und NMDA-Rezeptoren sowie PSD95 gegenüber exzitatorischen

Präsynapsen beobachtet [Garcia et al. 2000]. Zurzeit sind sowohl für die ErbB-Rezeptoren als auch für die NRG-Liganden keine geeigneten Antikörper für histologische Analysen erhältlich. So wird auch die ErbB4-Expression in der Literatur kontrovers diskutiert und die genau Lokalisation des Rezeptors ist ungeklärt [Gerecke et al. 2001; Yau et al. 2003; Mechawar et al. 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, welche Zellen ErbB4 exprimieren. Dabei konzentrierten sich die Analysen auf postnatale und adulte Stadien.

Die Expression der vier bekannten ErbB4-Splicevarianten konnte mit einer PCR-Analyse im adulten Kortex und Hippokampus von Mäusen nachgewiesen werden. Bei histologischen Analysen mit Hilfe chromogener *in situ* Hybridisierung (ISH) und Immunfärbungen wurde die ErbB4-mRNA überwiegend in kortikalen GABAergen Interneuronen lokalisiert. Dagegen waren nur wenige ErbB4-mRNA exprimierende Zellen GABA negativ, so dass innerhalb des Kortex nur eine sehr geringe Anzahl an Pyramidenzellen nachweisbare Mengen an ErbB4-mRNA exprimieren. Dafür spricht ebenfalls eine Expressionsanalyse im Rattengehirn, bei der gezeigt wurde, dass die kortikale ErbB4-Expression nur in wenigen Fällen mit der CaMKII-Expression überlappt [Yau et al. 2003]. In der vorliegenden Arbeit konnte die ErbB4-Expression in Pyramidenzellen nicht direkt untersucht werden, da mit den verwendeten CaMKII-spezifischen Antikörpern in Doppelfärbungen keine eindeutigen Signale erzeugt werden konnten. In Zukunft sollen daher weitere Pyramidenzell-spezifische Antikörper getestet werden. Allerdings unterstützen Beobachtungen in der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Mausmutante und Untersuchungen mit Hilfe einer Einzelzell-RT-PCR die Vermutung, dass nur eine geringe Anzahl von Pyramidenzellen nennenswerte Mengen an ErbB4-mRNA exprimieren.

Eine genauere Analyse der ErbB4-Expression in GABAergen Interneuronen erfolgte mit Hilfe der Kombination von chromogener ErbB4-ISH und fluoreszenter PV-Immunhistochemie (IHC). Die quantitative Analyse der Doppelfärbungen ergab, dass fast alle mit dieser Methode detektierbaren PV positiven Interneurone im Kortex (87%) und der CA1-Region des Hippokampus (90%) ErbB4-mRNA exprimierten. Nicht alle ErbB4-mRNA exprimierenden Zellen waren jedoch PV positiv. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied in der CA1-Region des Hippokampus, wo nur etwa 30% der ErbB4-mRNA positiven Zellen PV exprimierten. Im Kortex waren hingegen etwa 60% der ErbB4-mRNA exprimierenden Zellen auch PV positiv. Allerdings könnte ein größerer Prozentsatz der ErbB4-mRNA exprimierenden Zellen PV positiv sein. So wurden mit einer separat durchgeführten PV-ISH nahezu doppelt so viele PV positive Interneurone im Kortex und Hippokampus detektiert im Vergleich zu der PV-IHC. Die Expression von ErbB4 und PV könnte im Kortex nahezu komplett überlappen, da eine vergleichbare Anzahl PV- und ErbB4-exprimierender Zellen mit Hilfe von separat durchgeführten chromogenen ISH nachgewiesen wurden. In der CA1-Region des Hippokampus wurden jedoch etwa 32% mehr ErbB4-mRNA als PV-mRNA exprimierende Zellen detektiert. Daher ist es wahrscheinlich, dass ErbB4 zumindest im

Hippokampus auch von anderen Interneuronen exprimiert wird. Eine Expressionsstudie im Rattengehirn deutet auf eine ErbB4-Expression in nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*) positiven Interneuronen des Hippokampus hin [Yau et al. 2003]. In dieser Studie exprimierten annähernd 35% der ErbB4 positiven Zellen im Hippokampus nNOS. Dieses Neuropeptid wird in „Ivy“-Zellen exprimiert, die überwiegend die basalen Dendriten von Pyramidenzellen innervieren und möglicherweise eine Rolle bei oszillatorischen Netzwerkaktivitäten spielen [Fuatealba et al. 2008]. Ebenso ist eine Koexpression mit CCK (Cholecystokinin) möglich. Dieses Peptidhormon wird u. a. wie PV in Korbzellen des Hippokampus exprimiert. Dabei schließt sich die Expression dieser Marker gegenseitig aus [Kullmann and Lamsa 2007]. Korbzellen formen Synapsen mit dem Soma und den proximalen Dendriten von Pyramidenzellen und können so direkt auf diese Zellen einwirken [Markram et al. 2004]. Mit den bisherigen getesteten CCK-spezifischen Antikörpern konnte jedoch nach der ErbB4-ISH kein spezifisches Signal erzeugt werden. Dabei ist zu bedenken, dass nicht alle Antigene nach einer ISH für Antikörper noch vollkommen zugänglich sind. Die chromogene ISH ist eine relativ invasive Methode. Nur Antikörper, die ein robustes Signal erzeugen, können für die Analyse eingesetzt werden. Zukünftig sollen daher weitere Antikörper getestet werden, die gegen nNOS und CCK gerichtet sind. Die ErbB4-Expression wurde jedoch auch in anderen Interneuron-Populationen untersucht. So wurden die interneuronalen Marker Calretinin und Calbindin ebenfalls für die Koexpressionsanalyse verwendet. Dabei wurde fast keine überlappende Expression im Kortex sowie im Hippokampus beobachtet.

Ebenso wurde keine Kollokalisierung von ErbB4-mRNA mit dem Astrozyten-Marker GFAP im Kortex und Hippokampus von adulten Mäusen nachgewiesen. Diese Daten stimmen mit Studien überein, die die ErbB4-Expression im Rattengehirn untersuchten. Dort konnte der Rezeptor ebenfalls nicht in Astrozyten des Kortex und Hippokampus detektiert werden [Gerecke et al. 2001; Mechawar et al. 2007]. In einer weiteren Studie wurde ebenfalls keine ErbB4-Expression in kortikalen Astrozyten beobachtet, dagegen wurde der Rezeptor aber in GFAP positiven Astrozyten des Hypothalamus exprimiert [Ma et al. 1999]. Dort führt das durch ein ErbB2/ErbB4 Heterodimer vermittelte NRG1-Signal zur Freisetzung von Prostaglandin, das die Ausschüttung von LHRH (Luteinisierungshormon-freisetzendes Hormon) durch neurosekretorische Neurone stimuliert. In einer aktuellen Studie wurde zudem gezeigt, dass während der Entwicklung des Neokortex ErbB4 in neuronalen Vorläuferzell-Kulturen die Differenzierung zu Astrozyten inhibiert [Sardi et al. 2006]. Im Gegensatz zu anderen Hirnregionen und frühen Phasen der Kortexentwicklung, spielt der ErbB4-Rezeptor im adulten Gehirn für die Funktion kortikaler Astrozyten vermutlich keine entscheidende Rolle.

Die Koexpressionsanalyse zeigte eine prominente Lokalisation von ErbB4 in Neuronen, insbesondere in GABAergen Interneuronen des adulten Gehirns. Dabei exprimiert der überwiegende Anteil PV positiver Interneurone den Rezeptor. Die genaue subzelluläre Lokalisation von ErbB4 ist zurzeit noch unklar, wobei eine Expression des Rezeptors sowohl

in der Prä- als auch in der Postsynapse von Interneuronen vermutet wird [Garcia et al. 2000; Woo et al. 2007]. Parvalbumin wird vor allem in „*Chandelier*“-Zellen und Korbzellen exprimiert. „*Chandelier*“-Zellen innervieren Pyramidenzellen am Initialsegment des Axons (in der Nähe des Axonhügels), während Korbzellen Synapsen mit dem Soma und den proximalen Dendriten von Pyramidenzellen bilden [Klausberger and Somogyi 2008]. Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus erhalten auf dem Soma und dem Initialsegment des Axons überwiegend inhibitorische Synapsen. Auf diese Weise können die Interneurone gezielt auf die Aktivität der pyramidalen Neurone einwirken. Die perisomatische Innervierung ermöglicht einen Einfluss auf die Bildung und die zeitliche Koordination von Aktionspotentialen. Verschiedene Interneuron-Klassen regulieren dabei unterschiedliche Aspekte der Pyramidenzell-Aktivität. PV positive Interneurone können die neuronale Aktivität synchronisieren und sind an der Ausbildung der  $\gamma$ -Oszillation beteiligt [Bartos et al. 2002; Markram et al. 2004]. Die plastische Modulierung (die Feinabstimmung) des synaptischen Outputs von Pyramidenzellen erfolgt dagegen durch CCK positive Interneurone, die diese ebenfalls perisomatisch innervieren [Freund and Katona 2007]. Der NRG1-ErbB4-Signalweg könnte also an der Modulation von hippocampalen Oszillationsprozessen beteiligt sein.

## 5.2 Die ErbB4-Splicevarianten JMa und JMb dominieren in PV positiven Interneuronen

Wie schon dargelegt, liegt im früh adulten Gehirn der Maus eine prominente Koexpression von ErbB4 in PV positiven Interneuronen vor. Um die Funktion des Rezeptors genauer zu untersuchen, ist es aber auch entscheidend welche Isoformen exprimiert werden. Durch alternatives Splicen können vier strukturell und funktionell verschiedene Isoformen des ErbB4-Rezeptors entstehen. Die „*juxtamembrane*“ Region von ErbB4 kann dabei in der JMa- oder JMb-Variante vorliegen. Nur die JMa-Isoform kann von einer Metalloprotease proteolytisch prozessiert werden [Elenius et al. 1997; Rio et al. 2000]. Durch die proteolytische Prozessierung wird das extrazelluläre Fragment des Rezeptors freigesetzt. Diese Domäne kann als potentieller Ligand agieren und an NRG1 binden [Ferguson et al. 2000; Bao et al. 2003; Mei and Xiong 2008]. Auf diese Weise „tauschen“ der Ligand und der Rezeptor die Rollen und der NRG1-ErbB4-Signalweg verläuft in Richtung der Liganden exprimierenden Zellen ab. Das noch membrangebundene ErbB4 Fragment wird zudem möglicherweise von der  $\gamma$ -Sekretase weiterprozessiert. Der dadurch freigesetzte C-Terminus kann in den Zellkern transportiert werden, dort mit anderen Proteinen interagieren, z.B. mit YAP (*Yes-associated protein*) oder Nucleolin, und möglicherweise die Transkription von Zielgenen beeinflussen [Ni et al. 2001; Komuro et al. 2003; Omerovic et al. 2004; Di Segni et al. 2008]. So wurde *in vitro* in neuronalen Vorläuferzellen gezeigt, dass der freigesetzte ErbB4

C-Terminus mit TAB2 und dem Korepressor N-CoR einen Komplex formt, der die Transkription von glialen Genen inhibiert [Sardi et al. 2006].

Eine weitere Variation existiert im C-Terminus von ErbB4. Die ursprünglich entdeckte CYT1-Isoform des Rezeptors kann die p85 Untereinheit der PI3-Kinase binden [Elenius et al. 1999]. Bei der CYT2-Variante fehlen dagegen 16 Aminosäuren, die u. a. diese Bindestelle enthalten. Eine *in vitro* Studie zeigte, dass nur die CYT1-Isoform durch Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs Chemotaxis reguliert und anti-apoptotisch wirken kann [Kainulainen et al. 2000].

In der vorliegenden Arbeit konnten mit einer PCR-Analyse alle vier Isoformen im Kortex und Hippokampus von postnatalen und adulten Mäusen nachgewiesen werden. In Kollaboration mit Dr. Swen Hülsmann (Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen) erfolgte eine genauere Untersuchung mit Hilfe einer Einzelzell-RT-PCR in der CA1-Region des Hippokampus von 17 bis 24 Tage alten Mäusen. Bei der Einzelzell-RT-PCR wurde ausgehend von der RNA einer einzelnen Zelle die cDNA der verschiedenen ErbB4-Varianten amplifiziert. Die Analyse wurde in Pyramidenzellen und PV positiven Interneuronen durchgeführt. Dazu wurden zwei verschiedene transgene Mauslinien verwendet, die fluoreszente Proteine in Pyramidenzellen bzw. in PV positiven Interneuronen exprimierten. Auf diese Weise konnte die Expression des Rezeptors in Pyramidenzellen erneut überprüft werden. ErbB4 konnte nur in wenigen Pyramidenzellen nachgewiesen werden. So konnte nur in zwei pyramidalen Neuronen geringe Mengen der JMb-Isoform detektiert werden. Dagegen wurde der ErbB4-Rezeptor in allen analysierten PV positiven Interneuronen detektiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass ErbB4 in der CA1-Region des Hippokampus postnatal nicht oder nur in sehr geringen Mengen in Pyramidenzellen exprimiert wird.

Die Daten der Einzelzell-RT-PCR und der Koexpressionsanalysen deuten insgesamt auf eine prominente Expression von ErbB4 in GABAergen Interneuronen hin. Der Rezeptor konnte mit der Einzelzell-RT-PCR in allen PV positiven Interneuronen nachgewiesen werden. Dabei wurden hauptsächlich die JMb- und CYT2-Isoformen detektiert. Interessanterweise dominieren somit die Isoformen, die proteolytisch nicht prozessiert werden können bzw. nicht die PI3-Kinase binden. Eine aktuelle Studie zeigte, dass nach Ligandenbindung die CYT1-Isoform im Vergleich mit CYT2 effizienter ubiquitinyliert und damit schneller abgebaut wird [Sundvall et al. 2008]. Die postnatal überwiegend vorliegende ErbB4-Variante besitzt somit eine längere Halbwertszeit und steht länger für die Signal-Weiterleitung zur Verfügung. Modulationen des NRG-ErbB4-Signalwegs erfolgen daher vermutlich weniger über die Regulation der ErbB4-Transkription, sondern eher über posttranslationale Mechanismen, die die Aktivität von ErbB4 beeinflussen. Zudem kann der N-Terminus der vorliegenden ErbB4-Isoform nicht freigesetzt werden, so dass der Rezeptor vermutlich nur parakrin (durch Zell-Zell-Kontakt) agiert.

Die JMa- und CYT1-Varianten wurden nur in wenigen Interneuronen nachgewiesen. Meist kamen diese zusätzlich zu JMb und CYT2 vor. Für die postnatale Funktion von ErbB4 spielen der PI3-Kinase Signalweg sowie die proteolytische Prozessierung möglicherweise eine geringere Rolle. Die hier erhobenen Daten stehen im Einklang mit einer vor kurzem veröffentlichten Studie, in der in hippokampalen Neuronenkulturen von Ratten ebenfalls überwiegend die JMb-Splicevariante in GABAergen Interneuronen nachgewiesen wurde [Longart et al. 2007]. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten wildtypischen Expressionsanalyse konnte für die CA1-Region des Hippokampus dargelegt werden, dass ein Großteil der PV positiven Interneurone ErbB4 exprimieren und in diesen Zellen überwiegend die JMb- und CYT2-Isoformen vorliegen.

Eine weitere wichtige Frage betrifft die subzelluläre Lokalisation von ErbB4. Liegt der Rezeptor in der Prä- und/oder der Postsynapse vor? Verschiedene Studien haben eine Interaktion und Kolokalisation von ErbB4 mit PSD95 an der exzitatorischen Postsynapse in Pyramidenzellen und Interneuronen nachgewiesen [Garcia et al. 2000; Huang et al. 2000; Ma et al. 2003]. In einer aktuellen Studie wurde der Rezeptor zudem im präfrontalen Kortex von Mäusen in der inhibitorischen Präsynapse detektiert [Woo et al. 2007]. ErbB4 könnte also sowohl in der Prä- als auch in der Postsynapse von Interneuronen lokalisiert sein. Die meisten PV positive Interneurone in der CA1-Region des Hippokampus exprimieren ErbB4 und werden sowohl von den Schaffer-Kollateralen als auch von den CA1-Pyramidenzellen innerviert [Freund and Katona 2007] (und vorliegende Arbeit) Gleichzeitig formen PV positive Korbzellen untereinander viele Synapsen und innervieren wiederum CA1-Pyramidenzellen perisomatisch [Bartos et al. 2007]. Durch die Lokalisation des Rezeptors in der Prä- und Postsynapse kann der NRG1-ErbB4-Signalweg die synaptische Plastizität an verschiedenen Pyramidenzell-Interneuron- und Interneuron-Pyramidenzell-Synapsen beeinflussen und somit möglicherweise die Verbindung zwischen dem exzitatorischen und inhibitorischen Netzwerk modulieren.

### **5.3 Funktion des NRG1-ErbB4-Signalwegs bei der synaptischen Plastizität**

#### **5.3.1 Untersuchungen zur zelltyp-spezifischen Funktion von ErbB4**

Dem ErbB4-Rezeptor wurde in einer Reihe von Studien ein Einfluss auf die synaptische Plastizität in Pyramidenzellen zugeschrieben. Vor allem zu Beginn dieser Arbeit deutete viel auf eine Funktion in pyramidalen Neuronen hin [Ozaki et al. 1997; Rieff et al. 1999; Huang et al. 2000]. Zudem spielt der Rezeptor eine wichtige Rolle während der Entwicklung und Migration von Interneuronen [Yau et al. 2003; Anton et al. 2004; Flames et al. 2004]. ErbB4 wird auch im adulten Gehirn exprimiert, insbesondere in nahezu allen PV exprimierenden

Interneuronen (vorliegende Arbeit). Daher wurde der Frage nachgegangen, welche Funktion ErbB4 *in vivo* in Pyramidenzellen und Interneuronen ausübt.

Mit Hilfe einer konditionalen ErbB4 Mausmutante wurden dazu zelltyp-spezifische Nullmutanten hergestellt, in denen der Rezeptor erst postnatal durch eine Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination inaktiviert wurde. Zur Erzeugung einer Pyramidenzell-spezifischen Mutante wurde eine transgene Mauslinie (CaMKII-Cre) verwendet, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des  $\alpha$  CaMKII Promotors exprimiert [Minichiello et al. 1999]. Nach dem Einkreuzen einer Reportermauslinie wurde das Expressionsmuster der Cre-Rekombinase in der CaMKII-Cre-Mauslinie untersucht. Bereits bei Postnataltag (P) 5 wurden die ersten rekombinierten Zellen im Kortex und Hippokampus detektiert, deutlich früher als bei der ursprünglichen Analyse, in der vor P15 nur wenige Cre-Rekombinase exprimierende Neurone beobachtet wurden [Minichiello et al. 1999]. Im Gegensatz zu dieser Studie wurden in der vorliegenden Arbeit Tiere verwendet, die auf den C57Bl6N-Hintergrund zurückgekreuzt waren, wodurch es zu Änderungen in der transkriptionellen Regulation des Transgens kommen kann. Die Deletion von ErbB4 beginnt damit etwas früher als erwartet, aber immer noch spät genug, um die Analyse auf dessen postnatale Funktion zu beschränken. Die PV-Interneuron-spezifische Nullmutante wurde mit Hilfe einer transgenen Mauslinie (mPV-Cre) hergestellt, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PV-Promotors exprimiert [Fuchs et al. 2007]. Histochemische Analysen dieser Mauslinie zeigten, dass im Kortex und Hippokampus erst im Alter von 15 Tagen eine Expression der Cre-Rekombinase nachweisbar war. Damit setzt die Expression spät genug ein, um mit großer Wahrscheinlichkeit Defekte auszuschließen, die durch die embryonale Funktion des Rezeptors hervorgerufen werden. So verursacht eine embryonale Deletion von ErbB4 Migrationsdefekte von neuronalen Vorläuferzellen im RMS, sowie von GABAergen Interneuronen, die aus dem Subpallium in den Kortex wandern [Anton et al. 2004; Flames et al. 2004]. Außerdem ist die Funktion des Rezeptors entscheidend für die axonale Wegfindung von thalamo-kortikalen Fasern [Lopez-Bendito et al. 2006].

In der konditionalen ErbB4 Mausmutante wird das Exon 2 des ErbB4-Gens von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Für die ErbB4-Expressionsanalyse mit Hilfe einer quantitativen *real time* PCR (qRT-PCR) wurden daher Primer verwendet, die im Exon 2 und Exon 3 des ErbB4-Gens lokalisiert waren. Exon 2 wird durch die Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination herausgeschnitten, so dass in Cre-Rekombinase-exprimierenden Zellen kein ErbB4-Signal mehr erzeugt werden kann. Histochemische Analysen der CaMKII-Cre-Mauslinie zeigten eine prominente Expression der Cre-Rekombinase in nahezu allen Pyramidenzellen des Hippokampus und Kortex. Die Rekombination des ErbB4-Gens konnte außerdem auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. In der Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) konnte jedoch mit Hilfe einer qRT-PCR-Analyse im Hippokampus keine und im Kortex nur eine leichte Reduktion der Rezeptorexpression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde eine reduzierte Expression von ErbB4 in der Mutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) beobachtet.

Diese Ergebnisse sprechen daher für eine geringe ErbB4-Expression in Pyramidenzellen des adulten Gehirns. Diese Beobachtungen wurden durch eine *Western Blot*-Analyse und eine radioaktive ISH bestätigt. Mit allen Methoden konnte keine oder nur eine sehr geringe Reduktion des Rezeptors im Kortex und Hippokampus der Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) nachgewiesen werden. ErbB4 wird daher im postnatalen und adulten Gehirn nur in geringem Maße in Pyramidenzellen exprimiert. Die später erfolgte wildtypische Expressionsanalyse kommt zu demselben Schluss. Diese zeigte, dass nach P20 Pyramidenzellen im Kortex und Hippokampus nur noch geringe Mengen an ErbB4-mRNA exprimieren. Hingegen wurde der Rezeptor überwiegend in GABAergen PV exprimierenden Interneuronen nachgewiesen. Dagegen legten mehrere Studien eine Expression des Rezeptors in Pyramidenzellen des Hippokampus und Kortex von Mäusen und Ratten nahe [Gerecke et al. 2001; Fox and Kornblum 2005; Mechawar et al. 2007]. In diesen Studien wurde jedoch meist nicht direkt die zelltyp-spezifische Expression analysiert, sowie nur embryonale und früh postnatale Stadien näher untersucht. Im Kortex von 7 Tage alten Mäusen wurde zudem bereits eine partielle Kollokalisierung von ErbB4 und GAD67 beobachtet [Fox and Kornblum 2005]. Insgesamt weisen die in dieser Arbeit ermittelten Daten darauf hin, dass der NRG1-ErbB4-Signalweg nur einen geringen direkten Einfluss auf die Pyramidenzell-Pyramidenzell-Synapse ausübt. Dies steht im Widerspruch zu einer Reihe von Beobachtungen, dass ErbB4 eine Rolle bei der Plastizität der Pyramidenzell-Pyramidenzell-Synapse spielt [Gu et al. 2005; Kwon et al. 2005; Li et al. 2007]. Allerdings wurden diese Studien meist in Zell- oder Schnittkulturen mit Hilfe der rekombinanten EGF-Domäne von NRG1 durchgeführt. Indirekte Effekte durch die Expression des ErbB4-Rezeptors in GABAergen Interneuronen könnten ebenfalls die Plastizität der Pyramidenzell-Pyramidenzell-Synapse beeinflussen.

In der PV-Interneuron-spezifischen Nullmutante wurde im Gegensatz zur Pyramidenzell-spezifischen Nullmutante eine Reduktion von ErbB4 im Kortex und Hippokampus beobachtet. Die zur Herstellung der Nullmutante verwendete transgene Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase nicht in allen PV positiven Interneuronen [Fuchs et al. 2007]. Während im Hippokampus das Enzym in fast allen PV positiven Interneuronen nachgewiesen wurde, exprimieren im Kortex nur Subpopulationen dieser Interneurone das Transgen [Fuchs et al. 2007]. Interessanterweise ist in der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) die Reduktion der ErbB4-Expression im Kortex etwas ausgeprägter als im Hippokampus. Die wildtypische Expressionsanalyse zeigte entsprechend, dass die ErbB4- und PV-Expression im Kortex stärker überlappen als im Hippokampus. Der Rezeptor ist im Hippokampus wahrscheinlich deshalb nicht so prominent reduziert, weil dort auch andere Zellen ErbB4 exprimieren, wie z.B. nNOS positive Interneurone [Yau et al. 2003] (und eigene Daten). Mit der chromogenen ISH konnte im Gegensatz zur qRT-PCR- und *Western Blot*-Analyse keine Reduktion von ErbB4 nachgewiesen werden. Vermutlich wird trotz der Deletion von Exon 2 des ErbB4-Gens die gesamte RNA transkribiert. Die verwendete cRNA-Sonde enthält die komplette

ErbB4 Sequenz und hat so ausreichend Möglichkeiten mit komplementären Sequenzen zu hybridisieren. Ein Verlust stark ErbB4 positiver Zellen konnte aber mit einer Exon 2-spezifischen ISH-Sonde nachgewiesen werden. Eine quantitative Analyse dieser radioaktiven ISH ist nicht möglich. Welche Zellen den Rezeptor in der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) noch exprimieren, kann daher nicht genau beantwortet werden. Die Analyse der Cre-Rekombinase-Expression lässt aber vermuten, dass die meisten hippokampalen (aber nur Subpopulationen der kortikalen) PV positiven Interneurone rekombiniert sind. Das Expressionsmuster der Cre-Rekombinase in mPV-Cre Mäusen kann allerdings nur indirekt durch das Einkreuzen einer Reportermauslinie untersucht werden. Hierbei wird die Rekombination des Reporters in den doppeltransgenen Mäusen mit Hilfe der X-Gal-Histochemie nachgewiesen. Eine Doppel-Immunfärbung mit einem gegen die Cre-Rekombinase gerichteten Antikörper und (inter-) neuronalen Markern konnte noch nicht durchgeführt werden, da mit den zurzeit erhältlichen Cre-Rekombinase-spezifischen Antikörpern das Protein in postnatalen Gehirnschnitten nicht detektiert werden konnte. Um besser überprüfen zu können, wie viele PV positiven Interneurone in mPV-Cre Mäusen die Cre-Rekombinase exprimieren, werden zurzeit doppeltransgene Mäuse (mPV-Cre\*ROSA-lacZ) mit der mPV-EGFP Mauslinie gekreuzt, deren PV positiven Interneurone grün fluoreszieren. Dadurch wird zukünftig in trippeltansgenen Mäusen die Rekombination in PV positiven Interneuronen besser nachweisbar sein.

Die klassische ErbB4 Nullmutante stirbt bereits am Embryonaltag (E) 10,5 aufgrund eines Herzfehlers [Gassmann et al. 1995]. Um die postnatale ErbB4-Funktion untersuchen zu können, wurde in der klassischen Nullmutante ErbB4 unter einem Herzmuskel-spezifischen Myosin Promotor exprimiert [Tidcombe et al. 2003]. Im Kortex und Hippokampus dieser „*heart rescue*“ Nullmutante wurde bei P20 eine Reduktion GABAerger Interneurone festgestellt. Diese Reduktion wurde auf einen Migrationsdefekt der Interneurone aus dem Subpallium zurückgeführt [Flames et al. 2004]. Eine quantitative Analyse in der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) zeigte in 3 Monate alten Tieren keine veränderte Anzahl an PV positiven Interneuronen im Kortex und Hippokampus. In der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) wird also eine potentielle adulte Funktion von ErbB4 in PV positiven Interneuronen von der Funktion während der Entwicklung entkoppelt.

Die Deletion von ErbB4 könnte die Funktion anderer ErbB-Rezeptoren oder Liganden beeinflussen. Gegenseitige Regulationsmechanismen könnten auch zu einer veränderten Expression führen [Citri and Yarden 2006]. So ist z.B. eine Kompensation des ErbB4-Verlusts durch eine verstärkte Expression anderer ErbB-Rezeptoren oder Liganden denkbar. Überraschenderweise wurde im Hippokampus der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) tendenziell weniger ErbB2 und ErbB3 detektiert. Die Expression des potentiellen Liganden NRG1 hingegen war unverändert. In der Mutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) gab es hingegen keine Unterschiede im Expressionsniveau der ErbB-Rezeptoren und des NRG1-Liganden. NRG1 ist jedoch nur einer von mehreren Liganden, die an ErbB4 binden. So ist ErbB4 der

bevorzugte Rezeptor von NRG2 und NRG3, die beide im adulten Gehirn exprimiert werden [Longart et al. 2004]. Über die Funktion von NRG2 und NRG3 ist bisher noch nicht viel bekannt [Buonanno and Fischbach 2001; Falls 2003; Longart et al. 2004]. So konnten keine phänotypischen Veränderungen im Gehirn von NRG2 Nullmutanten beobachtet werden [Britto et al. 2004]. Elektrophysiologische Analysen einer transgenen Mauslinie, die NRG2 neuronal überexprimiert, zeigten hingegen eine Reduktion der LTP (T. Fischer, unveröffentlichte Daten; Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin). Daher ist geplant, die Expression dieser Liganden in beiden Nullmutanten ebenfalls zu untersuchen. Zudem soll die Expression von ErbB2 und ErbB3 in der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>fl/fl</sup>) in Zukunft eingehender analysiert werden.

### 5.3.2 Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren

Weder in der Pyramidenzell-spezifischen noch in der PV-Interneuron-spezifischen Nullmutante wurden neurodegenerative Veränderungen (z.B. erhöhte Apoptose, Mikroglia-Aktivierung oder Astrozytose) beobachtet. Selbst Mausmutanten mit einem zusätzlichen Allel des klassischen ErbB4 „knock-outs“ (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>fl/-</sup>) waren unauffällig. Diese Mutanten weisen nicht nur eine postnatale ErbB4 Deletion in Pyramidenzellen auf, sondern enthalten auch in allen Zellen ein Null-Allel des ErbB4-Rezeptors. Milde phänotypische Veränderungen könnten dadurch verstärkt werden. Dennoch wurden keine sichtbaren Unterschiede beobachtet. Analysen der „heart rescue“ Nullmutante zeigten eine überwiegend unveränderte Morphologie des Kortex und Hippokampus [Tidcombe et al. 2003; Flames et al. 2004; Fisahn et al. 2008], wobei die reduzierte Anzahl an Interneuronen sowie Veränderungen im Kleinhirn vermutlich durch embryonale Migrationsdefekte ausgelöst werden [Tidcombe et al. 2003; Flames et al. 2004]. Dass die postnatale, zellspezifische Deletion neurodegenerative Veränderungen verursacht, wurde daher nicht erwartet. Diese Mausmutanten eignen sich daher besonders für die Analyse molekularer Mechanismen, die der präzisen Regulation der Neurotransmission zu Grunde liegen.

Eine Regulation der synaptischen Plastizität durch den NRG1-ErbB-Signalweg wurden mit verschiedenen *in vitro* Studien sowohl für Pyramidenzellen als auch für GABAerge Interneurone nachgewiesen. Ältere Studien zeigten darüber hinaus einen deutlichen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren. So führte die Zugabe der rekombinanten EGF- $\beta$ -Domäne von NRG1 zu einer Kleinhirnschnittkultur zu einer dramatisch verstärkten Expression der NR2C-Untereinheit des NMDA-Rezeptors [Ozaki et al. 1997]. Die Expression von ErbB2 und ErbB4 in den Körnerzellen des Kleinhirns deuten daraufhin, dass diese Rezeptoren an der Vermittlung des NRG1-Signals beteiligt sind. In Primärkulturen von Körnerzellen des Kleinhirns konnte ebenfalls gezeigt werden, dass rekombinantes NRG1 die Expression der  $\beta$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors induziert [Rieff et al. 1999]. Der NRG1-ErbB4-Signalweg scheint auch die subzelluläre Lokalisation

der  $\alpha 7$ -Untereinheit des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors (nACh) beeinflussen zu können [Liu et al. 2001; Chang and Fischbach 2006]. Eine Studie mit Zellkulturen vom präfrontalen Kortex zeigte, dass rekombinantes NRG1 die NMDA-Rezeptor-vermittelten EPSCs (exzitatorische postsynaptische Ströme; *excitatory postsynaptic currents*) reduziert. Dabei wird die Reduktion dieser Ströme vermutlich durch eine Aktin-abhängige Internalisierung der NR1-Untereinheit enthaltenden NMDA-Rezeptoren verursacht [Gu et al. 2005]. Ebenso wurden nach der Stimulation mit der EGF- $\beta$ -Domäne von NRG1 *in vitro* reduzierte AMPA-Rezeptor EPSCs gemessen und eine Internalisierung von GLUR1 enthaltenden Glutamat-Rezeptoren beobachtet [Kwon et al. 2005]. Diese Studien liefern daher Hinweise auf eine Funktion des NRG1-ErbB4-Signalwegs bei der Modulation der synaptischen Plastizität durch eine Regulation der Expression und der subzellulären Lokalisation von Neurotransmitter-Rezeptoren.

Weder in der Pyramidenzell- noch in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante konnte mit einer qRT-PCR- oder mit einer *Western Blot*-Analyse eine Veränderung im Expressionsniveau der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors oder der GLUR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie, in der eine 16%ige Reduktion funktionsfähiger NMDA-Rezeptoren im Vorderhirn der heterozygoten NRG1 Nullmutante beobachtet wurde [Stefansson et al. 2002]. Obwohl ErbB4 mit PSD95 interagiert und eine *in vitro* Studie eine verbesserte Signalwirkung von NRG1 durch Interaktion des ErbB4-Rezeptors mit PSD95 gezeigt hat [Huang et al. 2000], konnte in der Mutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) kein Unterschied in der PSD95-Expression beobachtet werden. Der NRG1-ErbB4-Signalweg kann auch in Richtung der Liganden-exprimierenden Zelle verlaufen, in dem NRG1 als Rezeptor für ErbB4 fungiert. So führt ein NRG1-vermitteltes ErbB4-Signal in der Cochlea der Maus zur verstärkten PSD95-Expression durch Interaktion des NRG1 C-Terminus mit dem Zink-Finger Transkriptionsfaktor Eos [Bao et al. 2004]. Der postnatale Verlust von ErbB4 in PV positiven Interneuronen ist aber offensichtlich nicht essentiell für die Expression von PSD95 im Kortex und Hippokampus.

Wie erklären sich die geringen Konsequenzen der ErbB4-Deletion in den beiden Nullmutanten? In der vorliegenden Arbeit wurde die zelltyp-spezifische Funktion des ErbB4-Rezeptors im adulten Gehirn untersucht. Die unveränderte Expression der Neurotransmitter-Rezeptoren deutet daraufhin, dass der NRG1-ErbB4-Signalweg *in vivo* nicht essentiell wichtig ist für die Regulation der postnatalen Expression dieser Rezeptoren in Pyramidenzellen und PV positiven Interneuronen. Im Gegensatz dazu ist in der heterozygoten NRG1 Nullmutante bereits embryonal die Expression des Wachstumsfaktors in allen Zellen um 50% reduziert. Die Reduktion des NMDA-Rezeptors kann also möglicherweise durch den embryonalen Verlust der Funktion des NRG1-ErbB4-Signalwegs hervorgerufen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Expressionsanalyse der gesamte Hippokampus bzw. der kaudale Kortex verwendet. PV positive Interneurone stellen aber nur eine Subpopulation aller Zellen in diesen Regionen. Zudem zeigte die wildtypische

Expressionsanalyse, dass nur wenige Pyramidenzellen ErbB4 postnatal exprimieren. Daher sind möglicherweise mit den verwendeten Methoden (qRT-PCR, *Western Blot*) potentielle Unterschiede in der Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren schwer nachweisbar. Allerdings wurden in einer Pyramidenzell-spezifischen NRG1 Nullmutante, in der NRG1 postnatal inaktiviert wird, ebenfalls keine deutlichen Unterschiede bei der Expression der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und der GLUR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors beobachtet (A. Agarwal, nicht veröffentlichte Daten; Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass ErbB4 nicht die Expression dieser Rezeptoren beeinflusst, sondern deren Lokalisation oder Aktivität. Durch die Regulation von (nachgeschalteten) Proteinkinasen könnte ErbB4 u. a. auf den Phosphorylierungsstatus von Neurotransmitter-Rezeptoren einwirken. Eine aktuelle Studie konnte nachweisen, dass in Neuroblastoma-Zellen NRG1 durch Aktivierung von ErbB4 die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors stimulieren kann [Bjarnadottir et al. 2007]. Der ErbB4-Rezeptor aktiviert die Tyrosinkinasen Fyn und Pyk2, die möglicherweise für die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit direkt verantwortlich sind. Ebenso kann die subzelluläre Lokalisation von Neurotransmitter-Rezeptoren durch den NRG1-ErbB4-Signalweg beeinflusst werden. In kultivierten Pyramidenzellen des präfrontalen Kortex führte die Gabe von rekombinantem NRG1 zur Internalisierung der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Die NR1-Internalisierung wird vermutlich durch Aktivierung der PLC/IP<sub>3</sub>R/Ca<sup>2+</sup>- und Ras/MEK/ERK-Signalwege über einen Aktin-abhängigen Mechanismus vermittelt [Gu et al. 2005]. Mit einer Reihe von Experimenten sollen in Zukunft solche posttranskriptionellen Prozesse eingehender untersucht werden. Mit Hilfe von Synaptosomen Präparationen sollen die subzelluläre Lokalisation und der Phosphorylierungsstatus von Neurotransmitter-Rezeptoren biochemisch analysiert werden. Die subzelluläre Lokalisation dieser Rezeptoren soll zudem durch die Analyse von Immunfärbungen mit Hilfe konfokaler Mikroskopie eingehender untersucht werden. Allerdings ist bisher noch relativ wenig bekannt über die genaue Struktur und potentielle Marker der Pyramidenzell-Interneuron-Synapse. Erste vorläufige immunhistochemische Untersuchungen zeigten jedoch eine normale Morphologie der Synapsen (Daten nicht gezeigt). Zur Zeit finden außerdem elektrophysiologische Untersuchungen der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) statt (s. nächstes Kapitel).

### **5.3.3 Einfluss des NRG1-ErbB4-Signalwegs auf die synaptische Transmission**

Auch geringe Veränderungen synaptischer Eigenschaften können mit elektrophysiologische Untersuchungen detektiert werden. In einer Reihe von Studien wurde bereits eine Regulation der synaptischen Transmission durch den NRG1-ErbB-Signalweg beobachtet. So konnte ein Einfluss auf die Ausbildung der LTP an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse in

Schnittkulturen aus der Ratte nachgewiesen werden [Huang et al. 2000; Ma et al. 2003]. Die Applikation der EGF- $\beta$ -Domäne von NRG1 führte in diesen Studien zu einer Reduktion der LTP. Eine unveränderte *Paired-pulse facilitation* (PPF) deutet im Zusammenhang mit der reduzierten LTP zudem auf einen postsynaptischen Effekt hin. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit hippocampalen Schnittkulturen aus Mäusen durchgeführt [Kwon et al. 2005]. Dabei wurde ebenfalls eine Reduktion der LTP nach Applikation der EGF- $\beta$ -Domäne von NRG1 nachgewiesen. Mit den ErbB-Inhibitoren PD158780 und PD168393 wurde die Wirkung von NRG1 auf die Ausbildung der LTP aufgehoben. Die Inhibitoren alleine verursachten sogar eine Erhöhung der LTP, vermutlich durch die Blockade endogener Rezeptoren. Außerdem wurde in Ratten der Einfluss des Signalwegs auf die basale synaptische Transmission *in vivo* untersucht. Die Stimulation erfolgte in dieser Studie im entorhinalen Kortex. An der entorhinalen-CA1-Synapse führte die Applikation von rekombinantem NRG1 zur Reduktion der synaptischen Transmission, während der ErbB-Inhibitor PD158780 eine Erhöhung bewirkte [Roysommuti et al. 2003]. In einer weiteren Studie wurden zudem in kultivierten Pyramidenzellen des präfrontalen Kortex nach Gabe von rekombinanten NRG1 reduzierte NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme detektiert [Gu et al. 2005]. Vor Kurzem konnte außerdem in organotypischen Hippokampusschnittkulturen gezeigt werden, dass die Transfektion von ErbB4 in CA1-Pyramidenzellen zu verstärkten AMPA-Rezeptor Strömen und vergrößerten dendritischen Spines führt [Li et al. 2007]. Eine aktuelle Studie beobachtet einen Einfluss des Signalwegs auf die GABA-Transmission in Gehirnschnitten vom präfrontalen Kortex durch ErbB4-Rezeptoren, die in der inhibitorischen Präsynapse lokalisiert sind [Woo et al. 2007]. Diese Studien deuten damit alle auf eine Funktion des NRG1-ErbB-Signalwegs bei der synaptischen Transmission hin. Welcher Rezeptor das NRG1-Signal vermittelt, wird allerdings nicht abschließend beantwortet. Ebenso ist unklar, welche Synapsen oder welche Mechanismen beteiligt sind. Die verwendeten Inhibitoren blockieren reversibel die Autophosphorylierung von allen vier ErbB-Rezeptoren, unabhängig davon in welchem Zelltyp diese exprimiert werden. Die Regulation der LTP könnte also auch durch einen anderen Rezeptor vermittelt werden. Eine Beteiligung von ErbB4 ist aber sehr wahrscheinlich. So wird ErbB3 im adulten Gehirn vor allem in Gliazellen exprimiert [Schmucker et al. 2003; Anton et al. 2004; Fox and Kornblum 2005]. Die Expression in Neuronen ist dagegen umstritten [Gerecke et al. 2001]. ErbB2 wird in den Pyramidenzellen des Hippokampus exprimiert. Der Rezeptor besitzt allerdings keine Ligandenbindungsdomäne und dient als bevorzugter Heterodimerisierungspartner für die anderen ErbB-Rezeptoren [Citri et al. 2003; Fox and Kornblum 2005]. NRG1 bindet nicht direkt an ErbB1. Nur durch Heterodimerisierung mit ErbB4 ist der Rezeptor an der Vermittlung von NRG1-Signalen beteiligt [Jones et al. 1999; Carpenter 2003; Linggi and Carpenter 2006]. Potentielle Effekte von NRG1 auf die synaptische Plastizität werden also wahrscheinlich durch einen ErbB2/ErbB4-Heterodimer oder einen ErbB4/ErbB4-Homodimer vermittelt. Spielt ErbB4 in den Pyramidenzellen eine Rolle bei der Ausbildung der LTP,

müsste daher eine Veränderung in der Nullmutante (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) zu beobachten sein.

In Kollaboration mit Dr. Weiqi Zhang (Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen) wurde daher mit Hilfe der Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante elektrophysiologisch untersucht, ob der postnatale Verlust des ErbB4-Rezeptors in Pyramidenzellen zu einer Veränderung der synaptischen Plastizität in der CA1-Region des Hippokampus führt. Die basale synaptische Transmission war in den Nullmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) unverändert. Eine leichte Verbesserung wurde hingegen bei der PPF beobachtet. Allerdings gab es keinen signifikanten Unterschied bei der LTP. Lediglich die STP (Kurzzeit Potenzierung; *short-term potentiation*) war leicht erhöht. Zurzeit werden außerdem in den Nullmutanten (CaMKII-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) die AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme eingehender untersucht. Die Beobachtungen machen deutlich, dass der postnatale Verlust der ErbB4-Funktion in hippokampalen Pyramidenzellen keine negativen Auswirkungen auf die synaptische Plastizität in der CA1-Region des Hippokampus hat.

In einer erst kürzlich publizierten Studie wurde die LTP an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse der „*heart rescue*“ ErbB4 Nullmutante untersucht und eine Verstärkung der LTP nachgewiesen [Pitcher et al. 2008]. Außerdem wurde in wildtypischen Kontrollen erneut eine Erhöhung der LTP durch die Gabe des Inhibitors PD158780 und eine Reduktion der LTP durch NRG1 beobachtet, während NRG1 in der ErbB4 Nullmutante keinen Einfluss auf die Ausbildung der LTP hatte. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pyramidenzell-spezifischen ErbB4 Nullmutante fehlt bei der „*heart rescue*“ ErbB4 Nullmutante der Rezeptor aber in allen Zellen des Gehirns. Es liegt also nahe, dass die Verstärkung der LTP durch die Störung des NRG1-ErbB4-Signalwegs in anderen Zellen, wie z.B. den GABAergen Interneuronen, verursacht wird. Zusätzlich fehlt der Rezeptor bereits embryonal. Dadurch kann ein Beitrag embryonaler Defekte bei der Ausbildung synaptischer Dysfunktion nicht ausgeschlossen werden. ErbB4 wird wahrscheinlich während der Entwicklung in Pyramidenzellen exprimiert. Die Deletion des Rezeptors könnte in diesen Zellen zu dauerhaften Veränderungen in der Ausstattung oder Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren führen, die sich noch postnatal auswirken. In der „*heart rescue*“ ErbB4 Nullmutante wurde außerdem ein Migrationsdefekt von Interneuronen beobachtet, der zu einer verminderten Anzahl GABAerger Interneurone im Kortex und Hippokampus führt [Flames et al. 2004]. Die reduzierte Anzahl GABAerger Interneurone könnte sich ebenfalls auf die Ausbildung der LTP auswirken. Die stimulierten Schaffer-Kollateralen innervieren nicht nur Pyramidenzellen der CA1-Region, sondern auch eine Vielzahl von Interneuronen [Somogyi and Klausberger 2005]. Diese beeinflussen wiederum die Aktivität der Pyramidenzellen [Kullmann and Lamsa 2007]. Zusätzlich werden Interneurone auch von lokalen CA1-Pyramidenzellen stimuliert [Somogyi and Klausberger 2005]. Auf Pyramidenzellen wirken daher verschiedene inhibitorische Mechanismen ein. Die reduzierte Anzahl an Interneuronen könnte zu einer Störung dieses Netzwerks und somit zu einer

verminderten Inhibition der Pyramidenzellen führen. Die in der „*heart rescue*“ ErbB4 Nullmutante beobachtete Reduktion der LTP kann also durch eine Reihe von Veränderungen hervorgerufen werden. Die Analyse der Pyramidenzell-spezifischen Nullmutante sowie die wildtypische Expressionsanalyse machen deutlich, dass die gestörte LTP-Bildung nicht auf einen postnatalen Verlust der ErbB4-Funktion in Pyramidenzellen zurückgeführt werden kann.

Die in der Pyramidenzell-spezifischen Nullmutante beobachtete leichte Verbesserung der PPF deutet auf einen präsynaptischen Effekt hin. Außerdem ergab die Einzelzell-RT-PCR-Analyse, dass in (postsynaptischen) Pyramidenzellen der CA1-Region praktisch keine ErbB4-mRNA nachweisbar war. Ein direkter postsynaptischer Effekt war daher relativ unwahrscheinlich. Eine Funktion von ErbB4 in der Präsynapse der Schaffer-Kollateralen kann aber nicht ausgeschlossen werden, wobei in der „*heart rescue*“ Nullmutante (ebenso wie bei den *in vitro* Studien) keine Veränderungen der PPF beobachtet wurde.

Zahlreiche *in vitro* Studien haben eine Funktion des NRG1-ErbB-Signalwegs bei der Modulation der Neurotransmission der Pyramidenzell-Pyramidenzell-Synapse nahe gelegt [Huang et al. 2000; Ma et al. 2003; Roysommuti et al. 2003; Kwon et al. 2005]. Die Analyse der Pyramidenzell-spezifischen Nullmutante deutet jedoch daraufhin, dass ErbB4 in den Pyramidenzellen des adulten Gehirns keine derartige Rolle spielt. Eine Funktion des Rezeptors in pyramidalen Neuronen während der Entwicklung ist allerdings denkbar und könnte die beobachteten Effekte in den *in vitro* Studien ebenso erklären, wie eine mögliche Rolle von ErbB4 in anderen Zelltypen.

Die PV-Interneuron-spezifische Nullmutante bietet nun ein ideales Modellsystem, um die postnatale ErbB4 Funktion in Interneuronen bei der synaptischen Transmission zu überprüfen. Mit der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) werden daher zukünftig elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei soll u. a. auch die Ausbildung der LTP an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse analysiert werden. Die Deletion von ErbB4 kann sich hierbei nicht direkt auf die Transmission zwischen zwei Pyramidenzellen auswirken. Allerdings kann die regulatorische Funktion der PV positiven Interneuronen bezüglich pyramidalen Neuronen modifiziert sein. PV exprimierende Interneurone formen Synapsen mit dem Initialsegment des Axons und dem Soma der Pyramidenzellen. Damit befinden sie sich in einer besonders geeigneten Position, um auf die Aktivität (synaptischen Output) der Pyramidenzellen direkt einzuwirken. So sind PV positive Korbzellen maßgeblich an der Ausbildung der  $\gamma$ -Oszillation beteiligt [Bartos et al. 2007]. Durch ausgeprägte gegenseitige Innervierung synchronisieren PV positive Interneurone ihre Aktivität innerhalb des (Korbzellen-) Netzwerks, während über inhibitorische Synapsen auf Pyramidenzellen die Aktivität der Pyramidenzellen synchronisiert werden kann.

Elektrophysiologische Analysen von zwei Jahre alten Pyramidenzell-spezifischen NRG1 Nullmutanten zeigten eine signifikante Abschwächung der LTP an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse, wohingegen die basale synaptische Transmission unverändert war. Die

Untersuchung jüngerer Mutanten ist allerdings noch nicht abgeschlossen (A. Agarwal, nicht veröffentlichte Daten). Zur Herstellung dieser Mutante wurde ebenfalls die CaMKII-Cre Mauslinie verwendet. Aufgrund der Expressionsmuster der verschiedenen ErbB-Rezeptoren ist ErbB4 wahrscheinlich maßgeblich an der Weitergabe des NRG1-Signals beteiligt [Jones et al. 1999; Citri et al. 2003; Schmucker et al. 2003; Fox and Kornblum 2005]. In der Mutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) könnten daher ähnliche Störungen synaptischer Plastizität wie in der NRG1 Nullmutante vorliegen. Die prominente Expression von ErbB4 in PV positiven Interneuronen legt dabei eine veränderte Neurotransmission an der Pyramidenzell-Interneuron-Synapse nahe. Vor allem im Hippokampus wird ErbB4 allerdings auch in anderen GABAergen Interneuronen exprimiert [Yau et al. 2003] (und vorliegende Arbeit). Die Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) wird daher wahrscheinlich keine genaue Phänokopie der Pyramidenzell-spezifischen NRG1 Mutante darstellen. Außerdem werden im adulten Gehirn weitere ErbB4 Liganden (z.B. NRG2, NRG3) exprimiert. In einer Mausmutante, die NRG2 neuronal überexprimiert, wurde eine Reduktion der LTP an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse beobachtet (T. Fischer, unveröffentlichte Daten). Damit verursacht die Überexpression von NRG2 einen ähnlichen Effekt wie der chronische Verlust der Funktion von NRG1. Über die Funktion von NRG2 im Gehirn ist noch nicht sehr viel bekannt [Buonanno and Fischbach 2001; Falls 2003; Longart et al. 2004]. Ebenso wie NRG1 bindet NRG2 aber direkt an ErbB3 und ErbB4. Möglicherweise werden so in der Nullmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) auch NRG2 (bzw. NRG3) Effekte mit beobachtet. Aus diesem Grund kann nur sehr schwer vorhergesagt werden, wie sich die Deletion von ErbB4 in PV positiven Interneuronen auf die Ausbildung der LTP auswirkt.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der PV positiven Interneurone in der Mutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) sollen zusätzlich mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik analysiert werden. Auf diese Weise können Veränderungen auf zellulärer Ebene beobachtet werden. So ist geplant, die NMDA- bzw. AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme in den PV positiven Interneuronen zu analysieren. Dafür wird zurzeit eine transgene Mauslinie (mPV-EGFP) in die PV-Interneuron-spezifische Nullmutante eingekreuzt, deren PV positive Interneurone grün fluoreszieren. Durch die Expression des fluoreszenten Proteins eGFP in PV positiven Interneuronen können diese überhaupt erst elektrophysiologisch untersucht werden. Mit Hilfe dieser trippeltransgenen Mutante kann so zukünftig der Einfluss der postnatalen ErbB4 Deletion in PV positiven Interneuronen auf die synaptische Transmission an der Pyramidenzell-Interneuron-Synapse erstmals untersucht werden.

Eine detaillierte Analyse einer Pyramidenzell-spezifischen NRG1 Mutante mit verschiedenen Verhaltensexperimenten zeigte u. a. eine Störung von Lern- und Gedächtnisprozessen bei der pawlowschen Angst-Konditionierung (*fear conditioning*), Hypoaktivität sowie reduzierte PPI (Präpuls Inhibition; *prepulse inhibition*) (A. Agarwal nicht veröffentlichte Daten). An der der pawlowschen Angst-Konditionierung sind der Hippokampus und die Amygdala beteiligt. Die Störungen beim Lernen und der Gedächtnisbildung deuten also ebenso wie die

veränderte LTP-Ausbildung auf eine Dysfunktion im Hippokampus der Pyramidenzell-spezifischen NRG1 Mutante hin (A. Agarwal nicht veröffentlichte Daten). In Zusammenarbeit mit Prof. Ehrenreich (Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) werden zurzeit vergleichbare Verhaltensexperimente mit der Mausmutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>fl/fl</sup>) durchgeführt. Die Deletion des Liganden in Pyramidenzellen und des Rezeptors in PV positiven Interneuronen stellte eine ideale Möglichkeit da, die komplementären Funktionen bei der Regulation synaptischer Funktionen zu untersuchen. Die parallele Analyse dieser ErbB4 und NRG1 Nullmutanten kann zu einem besseren Verständnis der Rolle dieses Signalwegs in der synaptischen Plastizität führen.

#### 5.4 Rolle des NRG1-ErbB4-Signalwegs in Schizophrenie

In mehreren Studien wurden Varianten des NRG1- und ErbB4-Gens in verschiedenen Bevölkerungsgruppen als mögliche Risikofaktoren für Schizophrenie identifiziert [Stefansson et al. 2002; Hahn et al. 2006; Silberberg et al. 2006]. Besonders die vermutete Funktion in der synaptischen Plastizität macht den NRG1-ErbB4-Signalweg zu einem attraktiven Kandidaten, um bestimmte Aspekte der Pathophysiologie von Schizophrenie zu erklären [Huang et al. 2000; Ma et al. 2003; Kwon et al. 2005]. Verhaltensexperimente mit NRG1 und ErbB4 Mausmutanten unterstützen diese Hypothese. So zeigten heterozygote NRG1 und ErbB4 Nullmutanten ein „Schizophrenie-ähnliches“ Verhalten [Gerlai et al. 2000; Stefansson et al. 2002]. Zur Erklärung pathologischer Prozesse, die zur Ausbildung von Schizophrenie beitragen, wurde eine Reihe von Theorien entwickelt einschließlich solcher, die von einer Beteiligung (gestörter) dopaminerger, glutamaterger und GABAerger Netzwerke ausgehen. Der ErbB4-Rezeptor wird im adulten Gehirn überwiegend in GABAergen Interneuronen exprimiert (vorliegende Arbeit). Zudem zeigten eine Reihe von Studien einen Einfluss von NRG1 auf die Funktion von glutamatergen Neurotransmitter-Rezeptoren [Gu et al. 2005; Kwon et al. 2005; Bjarnadottir et al. 2007; Li et al. 2007]. So könnte der NRG1-ErbB4-Signalweg möglicherweise die Interaktion zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Netzwerken koordinieren.

Im dorso-lateralen präfrontalem Kortex (DLPC) von Schizophrenie-Patienten wurde eine Reduktion der GAD67- (Glutamat Decarboxylase) und GAT1 (GABA Transporter) -mRNA in PV positiven „*Chandelier*“-Interneuronen beobachtet [Akbarian et al. 1995; Lewis et al. 2005]. Gleichzeitig exprimieren diese Interneurone weniger PV-mRNA, die Anzahl PV positiver Interneurone ist hingegen unverändert. So scheint in Schizophrenie-Patienten häufig sowohl die GABA Synthese (durch GAD67) als auch die Wiederaufnahme (durch GAT1) in „*Chandelier*“-Zellen gestört zu sein. „*Chandelier*“-Zellen innervieren überwiegend, das Initialsegment des Axons von Pyramidenzellen [Klausberger and Somogyi 2008]. Interessanterweise wurde in Pyramidenzellen von Schizophrenie-Patienten im Initialsegment

des Axons eine erhöhte Dichte an GABA-Rezeptoren nachgewiesen, wodurch möglicherweise eine reduzierte perisomatische Inhibierung ausgeglichen wird [Lewis et al. 2005]. Der ErbB4-Rezeptor wird im adulten Gehirn überwiegend in GABAergen Interneuronen exprimiert, insbesondere in PV positiven Interneuronen (vorliegende Arbeit). Zwei Studien beobachteten eine Kolokalisation von ErbB4 mit PSD95 der Postsynapse kultivierter hippokampaler Neurone, möglicherweise auch in Interneuronen [Garcia et al. 2000; Huang et al. 2000]. Zudem wurde der Rezeptor in inhibitorischen Präsynapsen im präfrontalen Kortex von Mäusen detektiert [Woo et al. 2007]. In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, das rekombinantes NRG1 in kortikalen Schnittkulturen aktivitätsabhängig die GABA-Freisetzung erhöhen kann. Der NRG1-ErbB4-Signalweg könnte daher möglicherweise die synaptischen Eigenschaften dieser Interneuron-Pyramidenzell-Synapse beeinflussen und so eine veränderte Expression von NRG1 oder ErbB4 zu Veränderungen bei der Neurotransmission führen. Allerdings konnte in der PV-Interneuron-spezifischen ErbB4 Nullmutante keine Unterschiede im Expressionsniveau von GAD67 nachgewiesen werden, was wiederum durch den relativ spät einsetzenden Verlust der ErbB4-Funktion in der PV-Interneuron-spezifischen Nullmutante erklärt werden könnte.

PV positive Interneurone sind an der Ausbildung von  $\gamma$ -Oszillation maßgeblich beteiligt [Bartos et al. 2007]. Verschiedene Studien deuten daraufhin, dass diese synchronisierte Netzwerkaktivität in Schizophrenie-Patienten reduziert ist [Kwon et al. 2005; Wilson et al. 2007]. Erst vor kurzem wurde in der „*heart rescue*“ ErbB4 Nullmutante eine Störung bzw. Reduktion der  $\gamma$ -Oszillation beobachtet [Fisahn et al. 2008]. Die starke Überlappung der ErbB4- und PV-Expression lässt vermuten, dass eine Veränderung der  $\gamma$ -Oszillation auch in der Mutante (mPV-Cre\*ErbB4<sup>ff</sup>) beobachtet werden könnte.

In Rahmen dieser Arbeit wurde der postnatale Verlust des Rezeptors in Pyramidenzellen und PV positiven Interneuronen untersucht. Im DLPC von Schizophrenie-Patienten wurde hingegen in zwei Studien eine Überexpression der JMa- und CYT1-Isoform von ErbB4 beobachtet [Silberberg et al. 2006; Law et al. 2007]. Zudem wurde im präfrontalen Kortex von post mortem Gewebe eine deutlich erhöhte NRG1-induzierte Aktivierung des ErbB4-Rezeptors nachgewiesen [Hahn et al. 2006]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass nicht der Verlust der ErbB4-Funktion, sondern dessen Hyperaktivierung synaptische Fehlfunktionen auslöst. Aus diesem Grund wird zurzeit eine transgene Mauslinie hergestellt, die unter der Kontrolle eines in allen Zellen aktiven Aktin-Promotors eine gefloxt Stoppkassette, gefolgt von ErbB4 cDNA exprimiert. Durch Einkreuzen von Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinien, z.B. der mPV-Cre Mauslinie, kann ErbB4 somit Zelltyp-spezifisch überexprimiert werden. In Zukunft kann mit dieser Mauslinie die Auswirkung einer erhöhten ErbB4-Aktivität auf die synaptische Plastizität untersucht werden.

## 5.5 Expression von Epitop-markiertem NRG1 typ III in einer neuartigen transgenen Mauslinie

Die subzelluläre Lokalisation und das Prozessierungsmuster von NRG1 typ III in Neuronen des ZNS und PNS ist zurzeit noch nicht genau bekannt. Mit der bereits vorhandenen transgenen Mauslinie, die wildtypisches NRG1 typ III neuronal überexprimiert, kann die subzelluläre Lokalisation und die Prozessierung des Wachstumsfaktors nicht detailliert untersucht werden. Die zurzeit kommerziell erhältlichen NRG1-spezifischen Antikörpern erzeugen in histologischen Analysen keine reproduzierbaren Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine transgene Mauslinie hergestellt, die eine Epitop-markierte Variante der NRG1 typ III-Isoform unter Kontrolle des Thy1.2-Promotors exprimiert. Das nur 9 Aminosäuren große Hemagglutinin (HA) -Epitop wurde zur Markierung des N-Terminus von NRG1 verwendet. Es existieren mehrere HA-spezifische Antikörper, die für histologische und biochemische Analysen gut geeignet sind. Mit verschiedenen Methoden wurde *in vitro* die Funktionalität des Epitop-markierten NRG1 typ III überprüft. Die Überexpression des Transgens, die in Pyramidenzellen, Motorneuronen des Rückenmarks und sensorischen Neuronen der dorsalen Wurzelganglien nachgewiesen wurde, verursachte zudem eine signifikante Hypermyelinisierung im PNS und ZNS der transgenen Mäuse. NRG1 ist ein essentieller Regulator der Schwann-Zell-Differenzierung und Myelinisierung im PNS, wobei die Dicke der Myelinscheide von der Menge des axonalen NRG1 typ III reguliert wird [Lemke 2006; Nave and Salzer 2006]. So wurde in der transgenen Mauslinie, die nicht-markiertes NRG1 typ III neuronal überexprimiert, eine signifikante Hypermyelinisierung im PNS beobachtet [Michailov et al. 2004]. Auch im Gehirn führte die neuronale Überexpression von NRG1 typ III in dieser Mausmutante zu einer Hypermyelinisierung verschiedener Gehirnareale, z.B. des Corpus Callosum [Brinkmann et al. 2008]. Die Myelinisierungsfunktion von NRG1 typ III wurde also durch die Epitop-Markierung nicht beeinträchtigt.

Durch die Epitop-Markierung von NRG1 typ III eignet sich diese neuartige transgene Mauslinie besonders gut, um die subzelluläre Lokalisation des Transgens zu analysieren. In Zusammenarbeit mit Dr. Wiebke Möbius (Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) wurden erste histologische Analysen mit Kryo-Immuno-Elektronenmikroskopie durchgeführt, in denen NRG1 typ III an exzitatorischen Synapsen im ZNS lokalisiert werden konnte (vorläufige Daten).

Die N-terminale Markierung von NRG1 typ III mit zwei HA-Epitopen bietet zudem eine gute Möglichkeit die Prozessierung und subzelluläre Transportprozesse des Wachstumsfaktors näher zu untersuchen. Die NRG1 typ III Isoform enthält zwei Transmembrandomänen. Nach einer durch BACE ( *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme*) oder TACE (*tumor-necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*) vermittelten proteolytischen Prozessierung ist das N-terminale Fragment weiterhin membrangebunden [Horiuchi et al. 2005; Willem et al. 2006; Hu et al. 2008]. Der C-Terminus kann zumindest *in vitro* weiter prozessiert und in den Zellkern transportiert

werden [Bao et al. 2003]. Außerdem wird die Freisetzung der EGF-Domäne durch eine weitere proteolytische Teilung vermutet [Frenzel and Falls 2001]. So soll in Zukunft durch biochemische Analyse (*Western Blot*, Immunopräzipitation) von Synaptosomen-Präparationen überprüft werden, ob NRG1 typ III unprozessiert und/oder als N-terminales Fragment in Synapsen lokalisiert ist. Außerdem ist in Zusammenarbeit mit Viktorija Velanac (Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) geplant, die Expression, subzelluläre Lokalisation und das Prozessierungsmuster in dorsalen Wurzelganglien und im Ischiasnerven genauer zu untersuchen.

## 5.6 Kann NRG1 typ III die Myelinisierung von Dendriten auslösen?

Viele Axone im ZNS und PNS sind von einer Myelinscheide umgeben, die eine schnelle und präzise saltatorische Erregungsweiterleitung ermöglicht. Die Dendriten von Neuronen sind dagegen nicht myelinisiert. Selbst *in vitro* bilden Oligodendrozyten ausschließlich um Axone eine Myelinscheide [Lubetzki et al. 1993]. Die molekularen Mechanismen, welche zur selektiven Myelinisierung von Axonen führen, sind noch nicht bekannt. Das NRG1 typ III-Signal kann im ZNS die Dicke der Myelinscheide regulieren [Brinkmann et al. 2008]. Eine axonale Überexpression führt dabei zu einer Hypermyelinisierung von Axonen [Brinkmann et al. 2008] (und vorliegende Arbeit). In einem Nebenprojekt sollte untersucht werden, ob die ektopische Expression von NRG 1 typ III in Dendriten ausreichen würde, um eine Myelinisierung auszulösen.

Dazu wurde eine transgene Mauslinie hergestellt (Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM), die eine Variante von NRG1 typ III mit einem dendritisches Lokalisierungs-Motiv (DLM) exprimiert. Dieses 16 Aminosäuren lange Motiv ist ursprünglich im C-Terminus von Kalium-Kanälen der *Shal*-Familie enthalten. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Fusion des DLM zu einer Lokalisation des normalerweise unspezifisch lokalisierten Transmembranproteins CD8 in Dendriten führt [Rivera et al. 2003]. Darüber hinaus bewirkte eine Fusion dieses Peptids mit axonal lokalisierten Kalium-Kanälen einen Transport dieser Kanäle in die Dendriten [Rivera et al. 2003].

Zum Nachweis des Transgens wurde NRG1 typ III-DLM erneut zusätzlich N-terminal mit zwei HA-Epitopen markiert. Zunächst wurde gezeigt, dass die Funktion von NRG1 typ III durch das DLM *in vitro* nicht beeinträchtigt war. Die anschließend hergestellte Mausmutante exprimiert das Transgen u. a. in Pyramidenzellen des Kortex und Hippokampus und in Purkinjezellen des Kleinhirns. Allerdings wurde NRG1 typ III nicht nur membranständig, sondern auch im Zytosol der Neurone detektiert. In den Dendriten konnte das Transgen zudem nur schwach oder überhaupt nicht nachgewiesen werden. Purkinjezellen sind aufgrund ihrer großen Dendritenbäume besonders gut geeignet, um eine mögliche dendritische Myelinisierung zu untersuchen. In einer älteren Studie konnte bereits eine

partielle Myelinisierung dieser Dendriten ausgelöst werden [Hamori et al. 1980]. So wurden nach dem Durchtrennen der Kletterfasern (*climbing fibers*) vereinzelt myelinisierte Purkinjezell-Dendriten beobachtet. Außerdem konnte in heterozygoten Notch1 „*knock-out*“ Mäusen eine partielle Myelinisierung der normalerweise nicht-myelinisierten Parallelfasern in der Molekularschicht des Kleinhirns beobachtet werden [Givogri et al. 2002]. Aus diesen Studien kann man also schließen, dass Oligodendrozyten in die Molekularschicht des Kleinhirns einwandern können und neben Parallelfasern auch begrenzt Dendriten myelinisieren können. Obwohl NRG1 typ III in Purkinjezellen der transgenen Mauslinie exprimiert wird, konnte keine Myelinisierung der Purkinjezell-Dendriten beobachtet werden. Das DLM ist an den C-Terminus von NRG1 typ III fusioniert. Durch die proteolytische Prozessierung des Wachstumsfaktors wird dieses vom N-terminalen Fragment, das die EGF-Domäne enthält, abgetrennt. Abhängig davon, wann diese Prozessierung stattfindet, ist es möglich, dass nur das C-terminale Fragment ohne die EGF-Domäne in die Dendriten transportiert wird. Ebenfalls könnte ein genereller Transportdefekt vorliegen. So wurde 2xHA-NRG1 typ III-DLM auch im Zellkörper der Neurone detektiert. Es ist möglich, dass das DLM-Motiv den korrekten Transport zur Zellmembran stört, so dass die 2xHA-NRG1 typ III-DLM-Variante weniger effizient zur Zellmembran transportiert wird. Es konnte daher nicht abschließend geklärt werden, ob eine dendritische Expression von NRG 1 typ III eine Myelinisierung von Dendriten induzieren kann.

## 6 MATERIAL

### 6.1 Chemikalien und Reagenzien

Standardlaborchemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von handelsüblichen Firmen wie Amersham Biosciences (Freiburg), Boehringer Ingelheim (Ingelheim), Roche (Indianapolis, USA), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) BD Falcon (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Riedel de Haen (Hannover), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), BioRad (München), Invitrogen (Karlsruhe), VWR (Darmstadt) bezogen.

Acrylamid (30%)	Gerbu Trading
Agarose	Biozym, <i>Seakem LE agarose</i>
Ampicillin	Roche
BSA	Sigma-Aldrich
DAPI	Roche
Diaminobenzidin (DAB)	Dianova
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle</i> Medium (DMEM)	Gibco
DTT	Promega, Mannheim
Einbettmedium ( <i>Aqua Poly Mount</i> )	Polyscience Ltd.
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich; Fluka
FCS (fötales Kälberserum, ES-Qualität)	Gibco
Formaldehyd	Merck
Formamid	Fluka
Glutardialdehyd	Merck
Glycerin	Sigma-Aldrich
HBSS	Gibco
HS	Gibco
ITPG	Roth
Isopropanol	Merck
Kaisers Glyzeringelatine	Merck
Kanamycin	Roche
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Kommerzielles Nrg1- $\beta$ 1-EGF	R&D Systems, Wiesbaden
Selbst produziertes GST-Nrg1- $\beta$ 1	von T.M. Fischer, Göttingen
D-Luciferin	PJK
OPTI-MEM	Gibco
Paraformaldehyd	Serva
Penizillin/Streptavidin	Sigma-Aldrich
2-Propanol	VWR
SDS	Merck
Trypsin	Gibco
X-Gal	Roth

### 6.2 Verbrauchsmaterialien

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden bei handelsüblichen Firmen wie Eppendorf, BD Falcon, Greiner-Nunc (Nürtingen), Menzel-Gläser (Braunschweig) und Gilson (Middleton, WI, USA) bestellt.

ECL-Hyperfilme	Amersham Biosciences, Freiburg
Elektroporationsküvetten (0,1 und 0,4 mm)	Biorad, München
Filter-Einheiten, 150 und 500 ml	Nalgene, Rochester, NY, USA

Filterpapier 3-MM  
 Gelfiltrationssäulen (Bio-Spin 6, 30)  
 PVDF-Membran Hybond P  
 Objektträger, Deckgläschen  
 Zellkulturschalen, -platten  
 96-Loch-Platten für *real time*-PCR

Whatman  
 Bio-Rad  
 Amersham Biosciences  
 Menzel  
 BD Falcon  
 Applied Biosystems,  
 Warrington, UK

### 6.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

ECL Plus Western-Blot Detection Reagents  
 DeadEnd™ Colometric TUNEL System  
 Invisorb-DNA *Tissue Mini Kit*  
 LSAB2-Kit  
 pGEMT *Vector System I*  
 QIAfilter *Midi Kit*  
 QIAprep Miniprep Kit  
 QIAquick Gel Extraction Kit  
 QIAquick PCR Purification Kit  
 RNAeasy Lipid Tissue Kit  
 Power SYBR Green Master Mix (2x)  
 TRIZOL *Reagent*

Amersham Biosciences  
 Promega  
 Invitex, Berlin  
 DAKO  
 Promega  
 Qiagen, Düsseldorf  
 Qiagen  
 Qiagen  
 Qiagen  
 Qiagen  
 Applied Biosystems  
 Invitrogen

### 6.4 Geräte

Im Folgenden sind ausschließlich spezielle Geräte aufgelistet, die von einer Standardlaborausstattung abweichen.

Digitale Kameras  
     ProgRes C14  
     Kappa DX20 H-FW  
 GenePulser Xcell  
 Kryostat Jung CM 300  
 Microm HMP110  
 Microm AP 280  
 Mikrotom VT1000S  
 Mikrotom HM 400  
 Mikroskope  
     Axiophot  
     Leica DM IRBE (invers)  
     Leica DM RXA  
 Röntgen Film Entwickler KODAK XOMAT  
 7500 Fast Real-time PCR System  
 Spannungsgerät  
 SDS-PAGE Gelelektrophorese und  
 Western-Blot-Apparatur XCell Surelock  
 T3 Thermocycler  
 Ultra-Turrax Polytron PT1200  
 UV-Illuminator

Jenoptik, Jena  
 Kappa, Gleichen  
 Biorad, München  
 Leica, Solms  
 Microm, Walldorf  
 Microm  
 Leica  
 Microm  
 Zeiss, Göttingen  
 Leica  
 Leica  
 Kodak, Stuttgart  
 Applied Biosystems,  
 Warrington  
 Pharmacia GmbH,  
 Heidelberg  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Biometra, Göttingen  
 Kinematika AG, Luzern  
 Intas Science Imaging  
 Instruments GmbH,  
 Göttingen

## 6.5 Antikörper und Enzyme

### 6.5.1 Primärantikörper

Die für die immunhistochemische und biochemische Analyse verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab.1 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Primärantikörper**

Antikörper	Spezies	Quelle	Verdünnung	Methode
<b>monoklonale Antikörper</b>				
$\alpha$ -Actin	Maus	Sigma	1:1000	WB
$\alpha$ -Tubulin	Maus	Sigma	1:2000	WB
Ankyrin G	Maus	Santa Cruz	1:50	IHC
APP	Maus	Chemicon	1:750	IHC
Calbindin-D28	Maus	Sigma	1:300	IHC
CaMKII	Maus	Chemicon	1:100	IHC
GAD65	Maus	Sigma	1:500/1:4000	IHC/WB
HA	Maus	Convance	1:250/1:50	IHC/EM
HA	Ratte	Roche	1:1000	WB
MAC-3	Ratte	Pharmingen	1:400	IHC
NeuN	Maus	Chemicon	1:100	IHC
NMDAR1	Maus	Synaptic Systems	1:200/1:4000	IHC/WB
Parvalbumin	Maus	Sigma	1:2000	IHC/WB
PSD95	Maus	Upstate	1:10000	WB
PSD95	Maus	Affinity Bioreagents	1:400	IHC
S100 $\beta$	Maus	Novacastra	1:200	IHC
SMI32	Maus	Sternberger	1:500	IHC
<b>polyklonale Antikörper</b>				
Calretinin	Kaninchen	Chemicon	1:1000	IHC
ErbB4	Kaninchen	Santa Cruz	1:150/1:500	IHC/WB
ErbB4	Kaninchen	C.Lai	1:75	IHC
GABA	Kaninchen	Sigma	1:500	IHC
GAD67	Kaninchen	Chemicon	1:1000	IHC
GFAP	Kaninchen	Swant	1:500	IHC
GFP	Ziege	Rockland	1:1000	IHC
GLUR1	Kaninchen	Chemicon	1:600	WB
GLUR4	Kaninchen	Chemicon	1:300/1:600	IHC/WB
MAP2	Kaninchen	Chemicon	1:500	ICC
Neuroigin II	Kaninchen	F.Varoqueaux	1:4000	IHC
Olig2	Kaninchen	C.Stiles	1:200	IHC
Parvalbumin	Kaninchen	Swant	1:200	IHC
PSD95	Kaninchen	Frontier Science	1:500	EM
VGLUT1	Meerschweinchen	Chemicon	1:5000	IHC

## 6.5.2 Sekundärantikörper

Die für die immunhistochemische und biochemische Analyse verwendeten Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tab.2 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Sekundärantikörper**

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Verwendung
Alexa Fluor™ 488 Esel anti Maus	MoBiTec	1:2000	IHC
Alexa Fluor™ 555 Esel anti Kaninchen	MoBiTec	1:2000	IHC
AP-gekoppelt Schaf anti dig	Roche	1:2000	ISH
Cy™ 2 Ziege anti Kaninchen IgG	Dianova	1:100	IHC
Cy™ 2 Ziege anti Maus IgG	Dianova	1:100	IHC
Cy™ 3 Ziege anti Kaninchen IgG	Dianova	1:1000	IHC
Cy™ 3 Ziege anti Maus IgM	Dianova	1:1000	IHC
Cy™ 3 anti Meerschweinchen	Dianova	1:1000	IHC
Cy™ 3 Esel anti Ziege	Dianova	1:1000	IHC
HRP-gekoppelt Ziege anti Maus IgG	Dianova	1:5000	WB
HRP-gekoppelt Ziege anti Maus IgM	Dianova	1:5000	WB
HRP-gekoppelt Ziege anti Kaninchen	Dianova	1:5000	WB
HRP-gekoppelt Ziege anti Ratte	Dianova	1:5000	WB

## 6.5.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen vom Typ II (5-20 U/μl) wurden von Roche, Promega und New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Es wurden die mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet.

Calf intestine phosphatase	Roche
GOTaq DNA Polymerase	Promega
REDTaq™ DNA Polymerase	Sigma-Aldrich
RNasin	Promega
RQ1 DNase (RNase frei) (1 U/μl)	Promega
Superscript III-Reverse Transcriptase	Invitrogen
SP6 RNA Polymerase (15 U/μl)	Promega
T3 RNA Polymerase (17 U/μl)	Promega
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	Promega
T4 Polynukleotid-Kinase	Promega
T7 RNA Polymerase (20 U/μl)	Promega

## 6.6 DNA und Protein Marker

Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas

## 6.7 Lösungen und Puffer

### 6.7.1 Puffer und Stocklösungen für Molekularbiologie

DNA-Probenpuffer  
0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylencyanol  
15% Ficoll (Typ 400)  
in ddH<sub>2</sub>O

RNA-Probenpuffer  
50% Glyzerin  
1 mM EDTA  
0,1% Bromphenolblau  
0,1% Xylencyanol

50x TAE (1 Liter)  
2 M Tris-HCl  
1 mM EDTA pH-Wert 8  
57,1 ml Eisessigsäure

10x modifizierter Gitschier Puffer (MGB)  
6,70 ml 1M Tris-HCl, pH 8,8  
1,66 ml 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,65 ml 1M MgCl<sub>2</sub>  
auffüllen auf 10 ml mit ddH<sub>2</sub>O

1x MGB  
1,0 ml 10x MGB  
0,5 ml 10% Triton X-100  
8,5 ml ddH<sub>2</sub>O

LB- (*Luria-Bertani*) Medium  
1,0% Bacto Trypton pH 7,5  
0,5% Bacto Hefeextrakt  
1,0% NaCl  
1,5% Agar für Platten  
vor Benutzung autoklavieren

LB/Amp: 0,1 mg/ml Ampicillin in LB-Medium  
LB/Kan: 0,05 mg/ml Kanamycin in LB-Medium  
LB/Amp/IPTG:  
35 µg/ml X-Gal  
15 µg/ml IPTG  
0,1 mg/ml Ampicillin in LB-Medium

TB-(terrific-broth) Medium  
12 g Bacto Trypton  
24 g Bacto Hefeextrakt  
4 ml Glyzerin  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 900 ml auffüllen, autoklavieren  
100 ml Phosphat Puffer dazugeben:  
0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

TB jap.(Waschpuffer für kompetente Zellen)  
10 mM PIPES  
15 mM  $\text{CaCl}_2$   
250 mM KCl  
mit KOH auf pH 6,7 einstellen  
55 mM  $\text{MnCl}_2$

## 6.7.2 Lösungen für Immunhistochemie

4% Paraformaldehyd (PFA)  
450 ml ddH<sub>2</sub>O auf 65°C erwärmen, 20g Paraformaldehyd dazugeben, mischen, NaOH tropfenweise zugeben bis die Lösung klar wird, pH mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen, 50 ml 10x PBS dazugeben, runterkühlen auf 4°C, steril filtrieren

Karlsson-Schultz Fixativ (Elektronen Mikroskopie (EM))  
20 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
80 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1,0 g NaCl (f.c. 0,5%)  
50 ml 16% PFA (f.c. 4%)  
20 ml 25% Glutardialdehyd (f.c. 2,5%)  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 200 ml auffüllen, steril filtrieren

Eponmischung  
172,3 g Glycidether 100  
115,0 g 2-Dodecenybersteinsäureanhydrid (DDSA)  
89,0 g Methylnadac anhydrid (MNA)  
10 min rühren  
6,5 ml DMP-30  
20 min rühren

Eosinlösung  
0,1 g Eosin  
100 ml ddH<sub>2</sub>O  
1-3 Tropfen Eisessig

saures Hämalaun  
1,0 g Hämalaun  
0,2 g NaI  
50 g Kalialaun  
unter Schütteln in 1l ddH<sub>2</sub>O lösen  
50 g Chloralhydrat  
1,0 g Zitronensäure

HCl-Alkohol  
1,25 ml konz. HCl  
500 ml 70% EtOH

Phosphatpuffer  
0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
Gebrauchslösung pH 7,4  
20 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
80 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
100 ml ddH<sub>2</sub>O

PBS/BSA  
20 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
80 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1,8 g NaCl  
1,0 g BSA  
100 ml ddH<sub>2</sub>O

Trispuffer  
Stammlösung:  
0,5 M Tris pH 7,6  
vor Gebrauch 9 g NaCl zu 100 ml Stammlösung geben, auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

X-Gal-Färbelösung  
5 mM Kaliumferrocyanid  
5 mM Kaliumferricyanid  
2 mM  $\text{MgCl}_2$   
600  $\mu\text{l}$  20 mg/ml X-Gal in DMSO  
10 ml PBS

Zitratpuffer  
Stammlösung A:  
0,1 M Zitronensäure  
Stammlösung B:  
0,1 M Natriumcitrat  
vor Gebrauch 9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B in 450 ml ddH<sub>2</sub>O geben

### 6.7.3 Lösungen für *in situ* Hybridisierung

Hybridisierungs Puffer  
50% Formamid  
2% Blockierungsreagenz  
5x SSC depc  
0,02% SDS  
0,10% Sarcosyl  
steril filtrieren, bei -20°C aufbewahren

10x PBS  
1,3 M NaCl  
70 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
30 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

10x Maleinsäure Puffer  
1 M Maleinsäure  
75 g/l NaOH  
1,5 M NaCl  
mit 10 N NaOH auf pH 7,5 bringen, steril filtrieren

BCIP-Stammlösung  
50 mg/ml in 100% DMF  
bei -20°C lagern

NBT-Stammlösung  
75 mg/ml in 70% DMF  
bei -20°C lagern

Färbepuffer  
100 mM TrisCl pH 9.5  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>

20x SSC depc  
3 M NaCl  
0,3 M NaCitrat  
mit 1 M HCl auf pH 7 bringen  
1,5 ml DEPC dazu, ü. N. bei 37°C inkubieren, autoklavieren

TE-Puffer  
10 mM TrisCl pH 7.5  
1 mM EDTA

#### 6.7.4 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie

Modifizierter RIPA Puffer (Protein Lysis Puffer)  
50 mM Tris-HCl, pH 7,4  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0,1% SDS  
1,0% Natrium Deoxycholate  
1,0% Triton X-100

20x MES Elektrophorese Puffer  
1M MES  
1M Tris-Base  
2% SDS  
20 mM EDTA  
im Dunkeln aufbewahren, 1x Puffer pH 7,3

4x LDS-Probenpuffer  
564 mM Tris-Base  
424 mM Tris-HCl  
8% Lithiumdodecylsulfat (LDS)  
2,04 mM EDTA  
40% Glycerol  
7,5% *Serva Blue* G250 (1% Lösung)  
2,5% Phenol Rot (1% Lösung)  
bei -20°C aufbewahren; 1x Puffer pH 8,5

20x Transfer Puffer  
500 mM Bicine  
500 mM Bis-Tris  
20 mM EDTA  
1 mM Chlorobutanol  
bei 4°C aufbewahren, 1x Puffer pH 7,2

TBS-T (Waschpuffer)  
50 mM Tris-Base, pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,03% Tween 20

Membran "*stripping*" Puffer  
62,5 M Tris-HCl pH 6,7  
2% SDS

## 6.7.5 Puffer für Elektrophysiologie

Pipettenlösung (Einzelzell-RT-PCR)

140 mM KCl

1 mM CaCl<sub>2</sub>

2 mM MgCl<sub>2</sub> \*6 H<sub>2</sub>O

4 mM Na<sub>2</sub>ATP (Dinatrium Salz)

10 mM HEPES

10 mM EGTA

## 6.8 Mauslinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der lokalen Tierhaltungseinheit des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen gezüchtet. Sie wurden entsprechend den deutschen und den Richtlinien der Europäischen Union für Versuchstiere behandelt. Wildtypmäuse wurden entweder in der Tierhaltungseinheit gezüchtet oder von Charles River Laboratories, Bad Königshofen, bezogen.

Der verwendete Wildtypstamm war:

Inzuchtstamm C57/Bl6N

C57/Bl6 wurde von C.C. Little im Jahr 1921 aus einer Zucht von Abby Lathrop's Bestand weiterentwickelt, der auch zu den Stämmen C57BR und C57L führte. Stämme 6 und 10 wurden 1937 separiert.

Die verwendeten Mauslinien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tab.3 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Mauslinien**

Linien- kode	Mauslinie	Quelle	genetischer Hintergrund
ACTF	TgN(ACTFLPe)9205Dym	Jackson Lab	C57Bl6J
CKII	TgN(CaMKII-Cre)	Minichiello et al., 99	C57Bl6N
ErbB4	TgH(ErbB4 KO)	Gassman et al., 95	C57Bl6N
FERB	TgH(ErbB4 loxP Exon2)	Long et al., 03	C57Bl6N
HANI	TgN(Thy1.2-2xHA NRG1typIII)	vorliegende Arbeit	C57Bl6N
HNID	TgN(Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM)	vorliegende Arbeit	C57Bl6N
PARV	TgN(mPV-Cre)	Fuchs et al., 07	C57Bl6N
PAVG	TgN(mPV-EGFP)	Meyer et al., 02	C57Bl6N
ROSB	TgH(ROSA26 stop loxP LacZ)	Soriano, 99	C57Bl6N
TYFA	TgN(Thy1.2-EYFP)	Hirrlinger et al., 05	C57Bl6N

## 6.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms PrimerSelect des Programmpaketes DNASTar/Lasergene 7 ausgewählt und von Fritz Benseler (Abteilung Molekulare Neurobiologie, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) hergestellt. In Tabellen 4 bis 8 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung angegeben.

**Tab.4 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur molekularen Klonierung.**

Primer Nummer	Primer Sequenz (5'→ 3')	Fragment-grösse	Verwendung
6667	TGAGCCTTAGAGACAGGTGAAGTGTAT GCCTCGG	antisense	Amplifikation vom HAHA-NRG1 typ III N-Terminus aus pCMV2 NRG1 typ III
6672	CCAGATTACGCTCTTTACCCATACGAT GTTCCAGATTACGCTCTTGAGATTTAT CCCCAGACAT	485 bp	Amplifikation vom HAHA-NRG1 typ III N-Terminus aus pCMV2 NRG1 typ III
6673	TGGAATTCTAGAGTCGACGCCACCAT GTACCCATACGATGTTCCAGATTACG CTCTTTACCC	527 bp	Amplifikation vom HAHA-NRG1 typ III N-Terminus aus pCMV2 NRG1 typ III
6670	AAGTCACCAATAGCCGGCGGGCCAA AAGAACCAAG	370 bp	Amplifikation vom NRG1 typ III DLM C- Terminus aus pCMV2 NRG1 typ III
6674	GAGTCGACTTACGTGGTTTTCTCCAGG CAGTGAAGCAGGTGGTGGTGTGTGTC TCAAATACAGCAATAGGGTCTTGGT	370 bp	Amplifikation vom NRG1 typ III DLM C- Terminus aus pCMV2 NRG1 typ III
7545	CCGGTCCAAGAGCGTAATCTGGAACATC GTATGGGTAAAGAGCGTAATCTGGAACAT CGTATGGGTACATGGTGCCACTAGTGGTAC	antisense	Modifikation von pEGFP N1 zu pHAHA EGFP
7546	CACTAGTGGCACCATGTACCCATACGATGT TCCAGATTACGCTCTTTACCCATACGATGTT CCAGATTACGCTCTTGGGA	sense	Modifikation von pEGFP N1 zu pHAHA EGFP
9488	TTAGCTTTAGCCACCAGAG	333 bp	Amplifikation PV-ISH-Sonde aus P30 Kortex cDNA
9489	ATGTCGATGACAGACGTGCT	333 bp	Amplifikation PV-ISH-Sonde aus P30 Kortex cDNA

**Tab.5 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Genotypisierung.**

Linien-code	Primer Nummer /Sequenz (5'→ 3')	Bande(n) (bp)	Anlagerungs- Temperatur (°C)	Mauslinie
ACTF	5065: CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC 5066: CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG	tg 725	58	TgN(ACTFLPe) 9205Dym
CKII	5382: CCAGGCTAAGTGCCTTCTCTACA 5383: AATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT	tg 550	56	TgN(CaMKII-Cre)
ErbB4	3250: CAAATGCTCTCTGTCTTT GTGTCTG 3251: TTTTGCCAAGTTCTAATTCCAT CAGAAGC 3667: TATTGTGTTTCATCTATCATTGC AACCCAG	wt 314 KO 225	60	TgH(ErbB4 KO)
FERB	5893: CATCCTCTGTGTGCTTTTGTAC 6369: CTCGGTACTGCTGTTCCAGGTCA 7397: CGTATAGCATACATTATACGAAG	flox 500 wt 360 flox 200	57	TgH(ErbB4 loxP Exon2)
FERB	5893: CATCCTCTGTGTGCTTTTGTAC 9134: CAAATCTGTTGGTTGCCCATCTCTC	rek 600	58	TgH(ErbB4 loxP Exon2)
HANI	3775: CGATAAGTTTAGGAGCAGTTTGC AG 3776: TGGCAAAGGACCTTAGGCAGTGT	tg 800	56	TgN(Thy1.2-2xHA NRG1typIII)
HNID	3775: CGATAAGTTTAGGAGCAGTTTGC AG 3776: TGGCAAAGGACCTTAGGCAGTGT	tg 800	56	TgN(Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM)
PARV	5382: CCAGGCTAAGTGCCTTCTCTACA 5383: AATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT	tg 550	56	TgN(mPV-Cre)
PAVG	4749: CCAGCTTGTGCCCCAGGATGT 6895: GACACTGCAGCGCTGGTCAT	tg 500	57	TgN(mPV-EGFP)

**Tab.6 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung.**

Primer Nummer	Primer Sequenz (5'→3')	Sequenzierung
1956	TTCACCTTGATGCCGTTCT	von pHAHA EGFP N1
6457	TTCAGGGGGAGGTGTGGGAGG	von pCMV2 Konstrukten
6913	CTTCTGTGTGGGTGTCTGGCAT	von pCMV2/pTSC HAHA NRG1 typ III (DLM)
6914	CATTCTGGGCATACAGAAC	von pCMV2/pTSC HAHA NRG1 typ III (DLM)
6963	CCTGCTCTCAGCCAGACGGA	von pTSC HAHA NRG1 typ III (DLM)
6964	CGGAGCGTCTCAGAGGGTGC	von pCMV2 HAHA NRG1 typ III (DLM)
SP6	TAAATCCACTGTGATATCT	von subklonierten PCR-Produkten
T3	TTAATTGGGAGTGATTTCCC	von subklonierten PCR-Produkten
T7	ATTATGCTGAGTGATACCCGC	von subklonierten PCR-Produkten

**Tab.7 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide für Einzelzell- und RT-PCR.**

Zielgen	Primer Nummer	Primer Sequenz (5'→3')	Verwendung
β-actin	4262	GATATCGCTGCGCTGGTCGTC	äußere Primer
	4264	CATGGCTGGGGTGTGAAGGTC	
β-actin	9047	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	innere Primer
	9048	GGGAATGGGTCAGAAGGACT	
GAPDH	5479	TGATGGCATGGACTGTGGTCAT	einfache RT-PCR
	5480	CTACATGGTCTACATGTTCCAGTA	
ErbB1	4587	ATGCAGATGCCAATAATGTCTGC	einfache RT-PCR
	4588	GGAGATGTGGCTTCTCTTAACTC	
ErbB2	4585	GATGAGGAGGGCATATGTCAGCC	einfache RT-PCR
	4586	GCACTGTGGATGTCAGGCAGATG	
ErbB3	4583	CCAGATGCTCAGAATGAGTGCCG	einfache RT-PCR
	4584	CGCCCACTCTTGTCTCGATGAC	
ErbB4	4610	GGGCCAGTTGTTTCATTGAGG	einfache RT-PCR
	4611	GATCGGGAGTGCCACCCTTGC	
ErbB4 CYT	8304	GTAGCCTTCTTCATCCAGTTCT	äußere Primer
	8309	TGGCTAGAGACCCTCAAAGATAC	
ErbB4 CYT1	5614	AAACATCTCAGCCGTTGCACCCTG	innere Primer
	5620	AGTGAAATTGGACACAGCCCT	
ErbB4 CYT2	5614	AAACATCTCAGCCGTTGCACCCTG	innere Primer
	8306	GACTCCAATAGGAATCAGTTTGTG	
ErbB4 CYT1/2	5614	AAACATCTCAGCCGTTGCACCCTG	innere Primer
	5617	GCTGAGGAATATTTGGTCCCCCAG	
ErbB4 JM	4610	GGGCCAGTTGTTTCATTGAGG	äußere Primer
	5616	GAAATGTCCAGATGGCCTACAGGG	
ErbB4 JMa	5615	CTTTTTGATGCTCTTTCTTCTGAC	innere Primer
	5618	CATGCACGGGCCATTCCACCT	
ErbB4 JMb	5615	CTTTTTGATGCTCTTTCTTCTGAC	innere Primer
	5619	ACTGCATCGGCCCTGACGGATA	
ErbB4 JMa/b	5615	CTTTTTGATGCTCTTTCTTCTGAC	einfache RT-PCR
	5616	GAAATGTCCAGATGGCCTACAGGG	
NRG1 typ I	4582	TTTTGCAGTAGGCCACCACACACAT	einfache RT-PCR
	5409	GCCGAAGGCGACCCGAGC	
NRG1 typ II	4697	ACAGCAGGTACATCTTCTTCATGGA	einfache RT-PCR
	4698	CACAGAAAGTTTTCTCCTTCTCCGC	
NRG1 typ III	4579	CTGAAGTGGGTATTTGTGGACAAGAT	einfache RT-PCR
	4582	TTTTGCAGTAGGCCACCACACACAT	

**Tab.8 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide für quantitative *real time* PCR.**

Zielgen	Primer Nummer	Primer Sequenz (5'→ 3')
β-actin	9146	CTTCCTCCCTGGAGAAGAGC
	9147	ATGCCACAGGATTCCATACC
ATP5b	10568	GGCACAATGCAGGAAAGG
	10569	TCAGCAGGCACATAGATAGCC
ErbB2	9095	CGCTTTGTGGTCATCCAGA
	9096	CGGTAGAAGGTGCTGTCCAT
ErbB3	10890	CGAGAACTGCACCCAAGG
	10891	TCTGCTTGGCCTAAACAGTCT
ErbB4	11383	TCACCAGCATCGAGCACAACC
	11385	GTTGAGGGCCACCAGGAC
CaMKII	9708	TGTGTGGGAACACTTGGAGA
	9709	CTCACGCAAGAGGCATTTTT
GABA α <sub>2</sub>	10564	TCATGACGGAGCCTTTCTCT
	10565	ACAAAAAGAGGATGGGCTTG
GAD65	8882	CAAGTTCTGTTTCAGGTCATGGT
	8895	AGCGCCCTCTGCTTTATTTT
GAD67	9103	TGGAGATGCGAACCATGAG
	9104	GAAGGGTTCCTGGTTTAGCC
GluR1	9113	GCCCAATGCAGAGCTCAC
	9114	GTCACTCCACTCGAGGTAACG
GluR4	9139	CAGGATCTGAAACACCTCCAA
	9140	CAGCCATTACCAAGACACCA
NMDAR1	14705	CATTTAGGGCTATCACCTCCA
	14706	CACTGTGTCTTTTTGGTTTTGC
NRG1 pan	4767	GTGTGCGGAGAAGGAGAAAAC
	5353	TGGCAACGATCACCAGTAAACTCA
NRG1 typ III	9156	TGAGAACACCCAAGTCAGGA
	9157	CCCAGTCGTGGATGTAGATGT
mGluR5	12174	TGGGTCTAGCAGGGGAATTT
	12175	CCCATCTGTCACGTCATACCT
PV	9313	GGCAAGATTGGGGTTGAAG
	9314	CGAGAAGGGCTGAGATGG
PSD95	8886	CCCATCCATCTTTATCACCAA
	8899	TGCTGTGCTTGACCCTGA
18s RNA	9145	GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA
	9166	AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC

## 6.10 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengefasst.

**Tab.9 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit klonierten Plasmide und Transgenvektoren.**

DNA-Konstrukt	Verwendung	Ausgangs-Vektor
pGEM-T PARV	ISH-Sonde	pGEM-T
pHAHA EGFP	WB	pEGFP N1
pCMV2-2xHANRG1typIII	Zellkultur	pCMV2-NRG1typ III
pCMV2-2xHANRG1typIIIDLM	Zellkultur	pCMV2-NRG1typIII
pTSC-2xHANRG1typIIIβ1a	TgN(Thy1.2-2xHA NRG1typIII)	pTSC
pTSC-2xHANRG1typIIIβ1a DLM	TgN(Thy1.2-2xHA NRG1typIII DLM)	pTSC

**Tab.10 Übersicht über die verwendeten kommerziell erhältlichen und publizierten Plasmide.**

Vektor	Promotor	Ausgangs-Vektor	Quelle
pBluescript-KS	CMV		Stratagene
pEGFP N1	CMV		Clontech
pGEM-T	lac		Promega
pTSC	Thy1		Caroni et al., 97
pCMV2-NRG1typIII	CMV	pEGFP N1	C. Lai
pcDNA3 ErbB4	CMV	pcDNA3	C. Lai
pGEM-T E2	lac	pGEM-T	Anton et al., 04

## 6.11 Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie

COS7: Tumorzellen aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze, SV40 transformiert

Bakterienstamm

E.coli XL1-Blue

Stratagene

## 6.12 Hard- und Software

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und -vergleiche, Literatursuche) wurden mit Hilfe des Internetservice des *National Center for Biotechnology Information* (Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Sequenzanalysen, Primerdesign, DNA-Vergleiche und Proteinsequenzanalysen erfolgten mit dem Programmpaket *DNA Star/Lasergene 7*. Fotos wurde mit der Zeiss *LSM-Image-Software* und *Adobe Photoshop 7.0.1* bearbeitet. Abbildungen wurden mit den Programmen *Adobe InDesign 2.0* und Plasmidkarten mit *pDRAW32* erstellt. Daten wurden mit den Programmen *Excel 3.0* und *7500 Fast System 1.3.0* verarbeitet. Referenzen wurden mit dem Programm *Endnote X* archiviert.

## 7 METHODEN

### 7.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden richten sich, soweit nicht anders angegeben, nach [Sambrook et al. 1989] und nach Angaben der Hersteller.

#### 7.1.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Restriktionsverdau wurden mit Typ-II Restriktionsendonukleasen in Volumina von 20-200  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Die Wahl des 10x Reaktionspuffers richtete sich nach Herstellerangaben. 1 U Enzym schneidet im einfachen Verdau bei 37°C 1 pmol Schnittstellen pro h (für 1 Nukleotid gilt: 330 g=1 mol). Es wurde meist ein doppelter Überverdau durchgeführt.

#### 7.1.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die 5'-Phosphatgruppen geschnittener Vektoren wurden bei 37°C für 30 min mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (3 U/10  $\mu\text{g}$  DNA) entfernt, um eine Religation des Vektors ohne Insertion eines DNA-Fragments zu verhindern. Nach einer Aufreinigung mit Hilfe des *QIAquick Gelextraktionskits* nach Angaben der Hersteller wurde die DNA in 10-50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration eines Aliquots wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt.

#### 7.1.3 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte bei 4°C für 12-16 h, 16°C für 12 h oder RT für 4 h durch Inkubation mit T4 DNA Ligase, wobei Vektor und DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt wurden.

Ligationsansatz:

x $\mu\text{l}$	Vektor-DNA (50-100 ng)
x $\mu\text{l}$	<i>Insert</i> (150-300 ng)
1 $\mu\text{l}$	T4-DNA-Ligase (3 U)
1 $\mu\text{l}$	T4-DNA-Ligase Puffer (10x)
Auf 10 $\mu\text{l}$ mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	

#### 7.1.4 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden über Agarosegele oder mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* aufgereinigt und anschließend wie unter 7.1.3 beschrieben in den entsprechenden Ligationsansatz eingesetzt. Die Ligation erfolgte z.T. in pGem-T. Die Reaktion findet hierbei zwischen Adenosin-Überhängen, die die Taq-Polymerase während der PCR-Reaktion an 5'-Enden anfügt, und einem pGem-T Vektor mit Thymidin-Überhängen am 3'-Ende statt. PCR-Produkte mit endständigen Restriktionsschnittstellen, die durch die als Primer fungierenden Oligonukleotide eingebracht wurden, wurden zum Teil bei 37°C für 2 h dreifach überverdaut, über ein Agarosegel aufgereinigt, in ddH<sub>2</sub>O gelöst und ligiert.

### 7.1.5 Klonierung von Oligonukleotiden

Für die Herstellung des Vektors pHAHA EGFP wurden Oligonukleotide mit der Sequenz von zwei HA Epitopen von der DNA *Core facility* des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen, synthetisiert und direkt in den Vektor eingebracht. Dazu wurden die Oligonukleotide mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt. Je 5 µl der verdünnten *sense* und *antisense* Oligonukleotide wurden gemischt und bei 95°C 2 min inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen aufzuheben. Nachdem die so behandelten Oligonukleotide langsam auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden zwischen 10 und 30 ng für eine Ligation in den mit dem Restriktionsenzymen BamHI geöffneten Vektor pEGFP N1 eingesetzt.

### 7.1.6 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Zur Erzielung ihrer Transformationskompetenz wurden Bakterien (*E. coli* XL1-Blue [recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac (F- pro AB, lacIqZΔM15 Tn10(Tetr))]) in 1000 ml TB-Medium bei 18°C bis zu einer OD600 von 0,6 (24-40 h) inkubiert [Inoue et al. 1990]. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurde die Bakteriensuspension bei 4°C für 10 min mit 3000 rpm (Sorvall GS3-Rotor) zentrifugiert. Das in 200 ml kaltem TB Jap-Puffer (inkl. 2% (w/v) (DMSO)) resuspendierte Pellet wurde nach Inkubation für 10 min auf Eis bei 4°C für 10 min mit 3000 rpm (Sorvall GS3-Rotor) zentrifugiert und in 37,2 ml kaltem TB Jap-Puffer und 2,8 ml DMSO (f.c. 7%) aufgenommen. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurden Aliquots zu je 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

### 7.1.7 Transformation von Bakterien

100 µl transformationskompetente *E. coli* XL1-Blue-Bakterien wurden bei 4°C aufgetaut und auf Eis für 10 min mit 1,7 µl einer 1:10 Verdünnung von β-Mercaptoethanol in ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatzes und Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s. Darauf folgte ein zweiminütiger Abkühlungsprozess auf Eis, die Zugabe von 800 µl vorgewärmtem LB-Medium und eine anschließende Inkubation von mind. 45 min bei 37°C, währenddessen die Bakterien das Antibiotikum-Resistenzgen exprimieren. Anschließend wurden 0,1-1 ml auf antibiotikahaltige LB-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Vektoren mit der Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion wurden X-Gal/IPTG-haltige LB-Platten verwendet.

### 7.1.8 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden je 800 µl Flüssigkultur in antibiotikahaltigem LB-Selektionsmedium mit 200 µl autoklaviertem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 7.1.9 Präparation von Plasmiden aus Bakterien

Plasmidpräparationen basierten auf einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly [Birnboim and Doly 1979]. Die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (5-10 µg) beruhte auf der Bindung von DNA an eine Silikamembran unter Hochsalzbedingungen [Vogelstein and D 1979]. Zur Aufreinigung mittlerer (bis 100 µg) und großer Plasmid-Mengen (bis 500 µg) wurde ein Ionenaustauscher-Kunstharz verwendet (Qiagen). Für Präparationen in kleinem Maßstab wurden Bakterienkolonien von LB-Platten mit sterilen Zahnstochern in 3 ml LB-Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin oder 50 g/ml Kanamycin) überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Präparationen mittlerer bzw. großer Plasmid-Mengen erfolgten nach Animpfen von 25 bzw. 100 ml Übernachtskulturen in LB-

Selektionsmedium. Die Aufreinigung wurde mit *QIAprep-Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Qiagen Plasmid Handbuch).

### 7.1.10 Präparation genomischer DNA aus Mausgewebe

Genomische DNA (bis 50 µg) wurde aus Schwanzbiopsiematerial (ca. 0,5 cm) oder aus anderen Geweben mit dem Invisorb-DNA Tissue Mini Kit (Invitex) nach Angaben des Herstellers gewonnen und bei 4°C gelagert.

In einer weiteren Methode wurde außerdem genomische DNA aus Schwanzbiopsiematerial (ca. 0,5 cm) wie folgt präpariert. Nach dem Proteinase K Verdau (20 µl Proteinase K (10 mg/ml) in 180 µl MGB Puffer) ü. N. bei 55°C wurde 30 s bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Hitzeinaktivierung der Proteinase K erfolgte durch Inkubation für 15 min bei 90°C. Zur Pelletierung des unverdauten Gewebes wurden die DNA-Lysate 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt (1:2). Für die Genotypisierung über die PCR-Analyse wurde routinemäßig 1 µl eingesetzt.

### 7.1.11 Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe

Präparierte Mausgehirne wurden mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Kinematika) zerkleinert. Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Lipid Tissue Kit* (Qiagen). Sie wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Präparation von Kortex-Gewebe wurde immer nur die Region oberhalb des Hippokampus verwendet. Nach der RNA-Präparation wurden die Eluate bei -70°C eingefroren. Die Konzentration der RNA wurde spektrometrisch bei OD<sub>260</sub> vermessen.

### 7.1.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Lösung wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Nach Verdünnung der wässrigen Lösung (1:100) wurde die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht eine OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml; für RNA-Lösungen 40 µg/ml. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurde der Verunreinigungsgrad der Lösung bestimmt, wobei ein Wert von 1,5-2,0 für das Verhältnis OD<sub>260:280</sub> eine wenig verunreinigte Lösung anzeigt. Die Molarität einer Oligonukleotidlösung wurde über die Extinktionskoeffizienten E [M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>] der Nukleotide nach der Formel  $M = OD_{260} / E_{\text{gesamt}}$  ermittelt, wobei E<sub>gesamt</sub> die Summe der Extinktionskoeffizienten darstellt.

Guanin: E = 12010	Adenin: E = 15200	Thymin: E = 8400	Cytosin: E = 7050
-------------------	-------------------	------------------	-------------------

### 7.1.13 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 0,5 und 15 kb Größe wurden 0,7-2% Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE zum Lösen aufgekocht und nach Zusatz von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) in einen Gelschlitten gegossen. Die Proben Taschen wurden durch das Einsetzen verschiedener Gelkämme in den Gelschlitten erhalten. Der Schlitten wurde in eine Flachgelkammer gelegt und mit Laufpuffer (1x TAE) bedeckt. Vor dem Auftragen wurden die DNA Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die angelegte Spannung betrug abhängig von der Größe der Gelkammer und der Agarosekonzentration 30-160 V (5-10 V/cm). Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese nach der Elektrophorese auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht

und fotografiert werden. Als Größenmarker dienten entweder der 100 bp Marker oder der 1 kb Marker. Gelkammer, Kämme und Schlitten wurden von der institutseigenen Werkstatt hergestellt.

### 7.1.14 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das *QiaQuick Gel Extraction Kit* (Qiagen) verwendet. Der Gelbereich, der die aufzureinigende DNA enthält, wurde unter langwelligem UV-Licht (356 nm) mit einem Einwegskalpell aus dem Gel geschnitten. Das in ein Reaktionsgefäß überführte Gelfragment wurde nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 7.1.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion [Mullis et al. 1986] wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Als Zeitintervall für die Elongation wurde eine Rate von etwa 500 bp/min zu Grunde gelegt. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Verwendung zweier spezifischer Oligonukleotide (*sense*- bzw. *antisense*-Primer), die an komplementäre Bereiche denaturierter DNA binden können (*annealing*) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase, Temperaturoptimum 72°C). Da in jedem Zyklus die molare Menge der Matrizen-DNA verdoppelt wird, kommt es zum exponentiellen Wachstum der Zahl der DNA-Moleküle. Standardreaktionen fanden in einem Volumen von 20 µl statt.

Standardreaktion:

1 µl	Matrizen-DNA (10 pg - 100 ng)
0.5 µl	<i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl	<i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)
2 µl	dNTPs (2 mM)
2 µl	10x Red-Taq-Polymerase Puffer
0.7 µl	Red-Taq-Polymerase
13.3 µl	ddH <sub>2</sub> O

Ein Standard-Amplifikationsprotokoll mit 39 Zyklen:

95°C	3 min	Denaturierung	} 39 x
56°C	30 s	“ <i>annealing</i> “	
72°C	1 min	Elongation	
95°C	30 s	Denaturierung	
56°C	1 min	End-“ <i>annealing</i> “	
72°C	10 min	Endelongation	

Die Optimierung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von BSA, DMSO, Tween 20 oder „Substanz Q“ (Qiagen) und der Veränderung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, der Anlagerungs- und/oder der Elongationstemperatur oder der Zyklenzahl.

### 7.1.16 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen wurden von der DNA *Core facility* des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen, Arbeitsgruppe Fritz Benseler (Abteilung Molekulare Neurobiologie des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf einer linearen PCR unter Einsatz fluorochromer Substrate.

### 7.1.17 Reverse Transkriptase-PCR

Boten-RNA (mRNA) wurde durch Reverse Transkriptase (RT)-PCR nachgewiesen. Die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) wurde durch eine reverse Transkription unter Verwendung der *SuperscriptIII* Reversen Transkriptase (Invitrogen) synthetisiert. Zu 500 ng isolierter RNA (s. 7.1.11) wurden 4 µl „*random* Primer (Nonamer, 25 pmol/µl) gegeben. Der Probenansatz wurde dann auf 13 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, 10 min bei 70°C inkubiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5x *SuperscriptIII*-Puffer (Invitrogen), 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl DTT (100 mM) und 1 µl *SuperscriptIII* zugegeben. Die cDNA Synthese erfolgte in vier Inkubationsschritten (10 min, 25°C; 30 min, 50°C; 30 min 55°C, 15 min, 70°C). Der Ansatz wurde anschließend mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Es wurde als interne Kontrolle zusätzlich zu dem interessierenden Fragment ein 421 bp großes Fragment von GAPDH amplifiziert.

### 7.1.18 Einzelzell Reverse Transkriptase-PCR

Die Gesamt-RNA aus einer einzelnen Zelle wurde zur Synthese von cDNA verwendet. In Kollaboration mit PD Dr. Swen Hülsmann wurden Pyramidenzellen und Parvalbumin positive Interneurone aus der CA1 Region des Hippokampus (verwendete Mauslinien: PAVG, TYFA) *gpatched*. Die *Patch*-Pipetten waren mit 8 µl Pipettenlösung (140 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>ATP, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, pH 7,2) befüllt. Die Neurone wurden auf das Membranpotential geklemmt. Mit Spannungssprüngen wurden Aktionspotentiale erzeugt und die Feuerungsrate analysiert. Das Zytosol der Zelle wurde ausgesaugt und in ein Reaktionsgefäß überführt, das folgenden cDNA Synthese Ansatz enthielt:

1 µl	5x <i>SuperscriptIII</i> -Puffer (Invitrogen)
0,5 µl	dNTPs (2 mM)
1 µl	DTT (100 mM)
2 µl	<i>random</i> Primer (Nonamer, 25 pmol/µl)
0,5 µl	RNasin

Anschließend wurde 0,5 µl *SuperscriptIII* (Invitrogen) zugegeben und 1 h bei 42°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Aufgrund der geringen RNA-Konzentration einer Zelle wurden zur Amplifizierung der ErbB4 Isoformen und der β-Actin Kontrolle zwei PCR Runden durchgeführt. Zunächst wurde der gesamte Ansatz einer Zelle verwendet, um die interessierenden Fragmente zu amplifizieren.

Äußere PCR:

10 µl	cDNA Synthese-Ansatz
1 µl	4264 β-Actin <i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	4262 β-Actin <i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	4610 ErbB4 JM <i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	5616 ErbB4 JM <i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	8304 ErbB4 CYT <i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	8309 ErbB4 CYT <i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)
5 µl	dNTPs (2 mM)
10 µl	5x GO-Taq-Polymerase Puffer
0.25 µl	GO-Taq-Polymerase
2 µl	MgCl <sub>2</sub>
16.75 µl	ddH <sub>2</sub> O
50 µl	

Amplifikationsprotokoll:

94°C	2 min	Denaturierung	} 5 x
94°C	30 s	Denaturierung	
53°C	2 min	<i>annealing</i>	
72°C	35 s	Elongation	
94°C	30 s	Denaturierung	
53°C	30 s	<i>annealing</i>	} 40 x
72°C	35 s	Elongation	
72°C	7 min	Endelongation	

Von der ersten Runde wurden dann jeweils 3 µl des PCR Ansatzes verwendet um in separaten PCRs die verschiedenen ErbB4 Isoformen und die β-Actin Kontrolle zu amplifizieren.

Innere PCR:

3 µl	äußere PCR
1 µl	<i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)
5 µl	dNTPs (2 mM)
10 µl	5x GO-Taq-Polymerase Puffer
0.25 µl	GO-Taq-Polymerase
29.75 µl	ddH <sub>2</sub> O
50 µl	

Es wurde dasselbe Amplifikationsprotokoll verwendet wie bei der äußeren PCR.

### 7.1.19 Quantitative *real time* PCR

Die quantitative *real time* PCR wurde mit Hilfe des *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* und *SYBR Green Master Mix* nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Dabei wurde jeweils 5 µl *SYBR Green Master Mix*, 0,1 µl *antisense* Primer (10 pmol/µl), 0,1 µl *sense* Primer (10 pmol/µl) und 4,8 µl cDNA (~1-2 ng) pro Ansatz verwendet. Die PCR Reaktion erfolgte in einer 96-Loch-Platte nach folgendem Amplifikationsprotokoll: 10 min 95°C, 40 Zyklen: 15 s 95°C, 20 s 60°C, 40 s 72°C. Die *SYBR Green* Fluoreszenz wurde bei 72°C gemessen. Alle Reaktionen wurden als Triplikate oder Quadruplikate durchgeführt, deren Amplifikationskurven nahezu identisch waren. Die relative RNA Menge wurde im Bezug auf Haushaltsgene (ATP5b, β-Actin, 18S RNA) mit Hilfe der *7500 Fast System 1.3.0* und der auf Excel basierenden *qBase* (Hellemans et al., 07) *Software* berechnet.

## 7.2 Zellkultur

### 7.2.1 Allgemeine Techniken

Alle zur Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden routinemäßig auf Sterilität (sterile Werkbank HERAsafe KS, Heraeus, Langenselbold) überprüft und auf Mykoplasmenfreiheit untersucht. Alle Zellkulturen wurden in Zellkulturinkubatoren (Hera Cell 150, Heraeus) mit 5% CO<sub>2</sub>/95% Luft und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

## 7.2.2 Zelllinien

Es wurden die Zelllinie COS7 (Zelllinie aus Nierengewebe der afrikanischen grünen Meerkatze) verwendet. Die Zelllinie wurde in dem folgenden Zellkulturmedium kultiviert: DMEM (25 mM Glukose)/10% FCS.

## 7.2.3 Hippokampale Primärkulturen

Primärkulturen wurden aus den Hippokampi von E16 Wildtyp Mäusen von Giselheid Schulze (Arbeitsgruppe Mikael Simons des Max-Planck Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen) nach dem Protokoll von [Dotti et al. 1988] angelegt. Die Kulturen wurden nach 4-5 d für Transfektionen verwendet.

## 7.2.4 DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mit Lipofectamin

Bei dieser Methode wird die DNA in Liposomen verpackt und über Endozytose in die Zelle geschleust. Es wurde nach Angaben des Herstellers (Gibco-Invitrogen) gearbeitet. Die Zellen wurden in 24-Loch-Zellkulturschalen mit Deckgläschen ausgesät. Die Transfektion wurde durchgeführt, nachdem sich ein halbkonfluenten Rasen gebildet hat. Es wurde 1 µg DNA in 50 µl Opti-MEM I Zellkulturmedium (Gibco-Invitrogen, ohne Serum) verdünnt. Danach wurden 2 µl Lipofectamin in 50 µl Opti-MEM I gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die beiden Lösungen vereint. Nach gutem Schütteln wurde die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die DNA-Lipofectamin-Komplexe formen können. Es wurden 100 µl der DNA-Lipofectaminlösung zu jedem Loch mit Zellen und Medium gegeben. Die Platten wurden dann 8-24 h bei 37°C im Inkubator (unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung) kultiviert.

## 7.2.5 DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mit Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch ein äußeres elektrisches Feld ein transmembranes elektrisches Feld bei den Zellen induziert. Dieses transmembrane elektrische Feld wird üblicherweise durch einen kurzen direkten Strompuls erzeugt und ruft lokale Instabilitäten in der Zellmembran hervor, die „Elektroporen“ genannt werden. Während dieser Instabilitätsperiode ist es nun sogar Makromolekülen wie der DNA möglich, in die Zelle zu gelangen. Sind die Parameter optimal gewählt, erholen sich die Zellen nach dem elektrischen Puls wieder und können weiter in Kultur gehalten werden. Zur Elektroporation von COS-Zellen wurden pro Ansatz  $2-3 \times 10^6$  Zellen in 300 µl Elektroporationspuffer aufgenommen, mit den Parametern 1,7 kV, 200 Ohm und 25 µF in Elektroporationsküvetten (4 mm, Biorad) in einem GenePulser (Biorad) elektroporiert und anschließend unter Standardbedingungen für 24 – 48 h kultiviert.

## 7.3 Manipulation und Zucht von Mäusen

Im Alter von 4-6 Wochen wurden die Mäuse unter Verwendung eines Ohrstanzgerätes mit einem Lochcode markiert. Zur Verwaltung des Mausbestandes wurde das Datenbankprogramm PyRAT (Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden) verwendet.

### 7.3.1 Mikroinjektion von DNA in befruchtete Oozyten

Zur Injektion wurde das klonierte DNA-Konstrukt durch präparativen restriktionsenzymatischen Verdau von Vektorsequenzen befreit und mit Hilfe des *QiaQuick Gel Extractions Kits* (Qiagen) aufgereinigt. Die Elution erfolgte in Mikroinjektionspuffer (5 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA). Die erhaltene linearisierte DNA wurde in Mikroinjektionspuffer auf eine Konzentration von 30 ng DNA/µl eingestellt und die Qualität über eine Gelelektrophorese und anschließende Photodokumentation überprüft. Die Mikroinjektion wurde von Simone Emme (Tierhaus des Max-Planck Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt. Dabei wurde ein Pronukleusinjektionsverfahren nach Standardprotokollen verwendet [Gordon and Ruddle 1983].

### 7.3.2 Schwanzbiopsien

Schwanzbiopsien wurden üblicherweise im Alter zwischen 3 und 4 Wochen während des Absetzens von der Mutter durchgeführt, um daraus genomische DNA zur routinemäßigen Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR zu gewinnen. Dabei wurde ein etwa 0,5 cm langes Schwanzstück mit einer Schere entfernt. Die Schwanzbiopsie wurde in einem Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert.

## 7.4 Histologische und immunhistochemische Methoden

### 7.4.1 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion

Nach Anästhesie mit Avertin (20 µl/10 g Körpergewicht i.p.) wurde der Brustkorb der Maus geöffnet, das Herz freigelegt, eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und der rechten Vorhof durch einen Schnitt geöffnet. Die Kanüle war mit einer Peristaltikpumpe verbunden (Heraeus SR70, Flußrate 0.2-0.5 ml/s). Nach dem Ausspülen des Blutes mit ca. 20 ml HBSS wurde mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert, das Gehirn und weitere Gewebe präpariert und bei 4°C für 1-2 h in der Fixierungslösung nachfixiert. Anschließend überführte man dieses in 18-30%iger Saccharoselösung. Nach dem Absinken wurde das Gehirn auf Trockeneis weggefroren und bei -70°C gelagert oder direkt am Vibratom oder Kryostaten geschnitten.

Für die Fixierung von Mäusen wurden abhängig von der weiteren Verwendung des Gewebes verschiedene Fixierungslösungen verwendet. Für die Elektronen Mikroskopie wurde das Karlsson-Schultz Fixativ verwendet und das Gewebe anschließend in dem Fixativ bei 4°C gelagert. Die P50 Mäuse für die *in situ* Hybridisierungen wurden mit einem abgewandelten Protokoll perfundiert. Hierbei wurde das Blut mit 0,9% NaCl-Lösung ausgespült und mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in 100 mM Borat Puffer (pH 9,5) fixiert.

### 7.4.2 Herstellung von Vibratomschnitten

Gehirne, die gewonnen wurden wie unter 7.4.1 beschrieben, wurden in eiskaltem PBS (pH 7,4) an einem Leica VT1000s Vibratom geschnitten. Die schwimmenden Schnitte in einer Dicke von 30-100 µm wurden in eiskaltem PBS (pH 7,4) in 24 Lochschalen bis zu einer Woche bei 4°C zur weiteren Prozessierung durch immunhistochemische Analyse aufbewahrt.

### 7.4.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Mäuse wurden wie unter 7.4.1 mit 4% PFA fixiert, die Gehirne und weitere Gewebe präpariert und noch 2 h in Fixierlösung nachfixiert. Anschließend wurden die Gehirne mit Hilfe eines Gewebe-Infiltrationsautomaten (MICROM HMP 110, Programm: 50% EtOH 1 h, 70% EtOH 2 h, 70% EtOH 2 h, 96% EtOH 1 h, 96% EtOH 1 h, 100% EtOH 1 h, 100% EtOH 1 h, Isopropanol 1 h, Xylol 2 h, Xylol 2 h, Paraffin 2 h, Paraffin 2 h) paraffiniert und an einer Paraffin-Ausgießstation (MICROM AP 280) eingebettet. Die 5-10 µm dicken Paraffinschnitte wurden an einem Schlittenmikrotom (MICROM HM 400) angefertigt.

### 7.4.4 Herstellung von Kryostatschnitten

Mit Hilfe des Jung CM 300 wurden 14-20 µm dicke Kryostatschnitte bei -15°C bis -25°C hergestellt und auf Adhäsions-Objekträger aufgezogen. Nachdem die Schnitte für 5 bis 60 min bei RT luftgetrocknet waren, wurden sie 10 min in 4% PFA fixiert und anschließend dreimal 5 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden für 3 h bis ü. N. im Exikator getrocknet und bei -70°C gelagert.

### 7.4.5 Herstellung von Semi-Dünnschnitten

Die Mäuse wurden durch Perfusion (s. 7.4.1) mit Fixans nach Karlsson & Schulz fixiert. Die zu untersuchenden Gewebe wurden präpariert, in etwa 4 mm lange Stücke zerteilt und im Gewebeeinfiltrationsautomaten (Lynx) nach folgendem Schema weiter prozessiert:

Reagenz	Dauer	Temperatur
ddH <sub>2</sub> O	15 min	4°C
2% OsO <sub>4</sub>	4 h	4°C
ddH <sub>2</sub> O	20 min	RT
ddH <sub>2</sub> O	20 min	RT
ddH <sub>2</sub> O	20 min	RT
30% Ethanol	30 min	RT
50% Ethanol	30 min	RT
70% Ethanol	30 min	RT
90% Ethanol	30 min	RT
100% Ethanol	15 min	RT
100% Ethanol	15 min	RT
100% Ethanol	15 min	RT
100% Ethanol	15 min	RT
Propylenoxid	15 min	RT
Propylenoxid	15 min	RT
Propylenoxid	15 min	RT
Propylenoxid/Epon 2:1	2 h	RT
Propylenoxid/Epon 1:1	2 h	RT
Propylenoxid/Epon 1:2	4 h	RT
Epon rein	4 h	RT

Anschließend wurden die Proben auf vorpolymerisierten Eponblöckchen ausgerichtet, mit Epon überschichtet und 24 h bei 60°C ausgehärtet. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms wurden Semidünnschnitte (0,5 µm) angefertigt und nach [Richardson 1960] gefärbt (für lichtmikroskopische Untersuchungen).

#### 7.4.6 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

Für die Hämatoxylin/Eosin- (Hämalaun/Eosin) Färbung (Hämalaun ist ein pH-veränderter Hämatoxylin Farbstoff; Hämatoxylin ist acidophil und färbt Chromatin in den Zellkernen blau; Eosin färbt das Zytoplasma (evtl. den Golgikomplex) rot) wurden Paraffinschnitte bei RT folgendermaßen behandelt. Zunächst erfolgte eine Entparaffinisierung, indem die Schnitte 2x 10 min in Xylol, 10 min in Isopropanol/Xylol und je 5 min in 100%, 90%, 70%, 50% EtOH und ddH<sub>2</sub>O inkubiert wurden. Für die Färbung wurden die Schnitte 5 min in saurem Hämalaun (frisch filtriert) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in ddH<sub>2</sub>O und HCl-Alkohol. Dann wurden die Schnitte 10 min in Leitungswasser gebläut, mit ddH<sub>2</sub>O gespült und erneut gefärbt (5 min alkalisches Eosin). Zuletzt wurden die Paraffinschnitte in ddH<sub>2</sub>O gespült und je 5 min in 50%, 70%, 90% und 100% EtOH dehydriert. Um die Schnitte einzudecken, wurden sie für 10 min in Isopropanol/Xylol und 2x 10 min in Xylol inkubiert und mit Eukitt eingedeckt.

#### 7.4.7 TUNEL-Färbung

Die Darstellung von Apoptose auf Paraffinschnitte erfolgte mit dem *DeadEnd™ Colometric TUNEL System* (Promega) nach den Angaben des Herstellers.

#### 7.4.8 Histochemische Analyse der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität auf Vibratom- und Kryostatschnitten

Die X-Gal Histochemie wurde auf gleiche Weise mit schwimmenden Vibratomschnitten und Kryostatschnitten durchgeführt. In der frisch angesetzten Färbelösung wurden die Schnitte im Dunkeln bei 37°C 10 min – 16 h inkubiert. Nach der Färbung wurde dreimal 5 min in PBS gewaschen und anschließend für eine immunhistochemische Analyse eingesetzt (s 7.4.9) oder direkt in Aqua Poly Mount oder mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt.

#### 7.4.9 Immunhistochemische Analyse auf Vibratom- und Kryostatschnitten

Das Protokoll kann mit Vibratom- und Kryostatschnitten durchgeführt werden. Die Schnitte wurden 30 min in 0.4% Triton-X100/PBS permeabilisiert und 30 min in 0.4% HS, 0.2% Triton-X100/PBS blockiert. Die Inkubation mit in 1% HS, 0.05% TritonX-100/PBS verdünnten Antikörpern erfolgte ü. N. bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte 2x 5 min in PBS gewaschen und für 2 h bei RT im Dunkeln mit einem speziesspezifischen, Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper und DAPI (0,5 µg/ml, zur Darstellung der Kerne) in 1,5% HS/PBS inkubiert. Nach 2x 5 min Waschen in PBS wurden die Vibratomschnitte in Wasser aufgezogen und in *Aqua Poly Mount* eingedeckt. Die Kryostatschnitte konnten direkt eingedeckt werden.

#### 7.4.10 Immunhistochemische Analyse auf Paraffinschnitten

Es wurden 5 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebetteten Gehirnen angefertigt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Durch eine zehnmündige Inkubation bei 60°C und eine absteigende Alkoholreihe (2x 10 min in Xylol, 10 min in Isopropanol/Xylol und je 5 min in 100%, 90%, 70%, 50% EtOH und ddH<sub>2</sub>O) erfolgte zunächst die Entparaffinisierung der Schnitte, danach ein Inkubationsschritt in 10 mM Zitratpuffer, pH 6 (5 min). Anschließend wurden die Schnitte 10 min in heißem 10 mM Zitratpuffer, pH 6 bei 650 Watt in der Mikrowelle gekocht und 20 min bei RT abgekühlt. Für die Detektion der primären Antikörper wurden zwei Methoden verwendet.

#### a) DAKO-LSAB2-System

Nach kurzer Inkubation in Trispuffer (pH 7,6) mit 2% Milchpulver wurden die Objektträger in das Coverslip-System (DAKO, Glostrup, Dänemark) eingesteckt und nochmals mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) mit 2% Milchpulver gespült, um den Sitz der *Coverplates* zu überprüfen. Es folgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch fünfminütige Inkubation mit 100 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nach Spülen mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) mit 2% Milchpulver wurden die Schnitte bei RT 10 min mit 1:5 verdünntem ZS in PBS/BSA (jeweils 100 µl) inkubiert, um unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Das ZS wurde dekantiert und die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in BSA/PBS ü. N. bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) mit 2% Milchpulver gewaschen und 10 min bei RT mit dem biotinylierten Brückenantikörper (DAKO LSAB2) inkubiert. Nach Spülen mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) mit 2% Milchpulver wurde der Meerrettich-Peroxidase-Streptavidin-Komplex (DAKO LSAB2) appliziert; die Inkubation erfolgte wiederum für 10 min bei RT. Nach erneutem Spülen mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) wurden die Objektträger liegend weiterbehandelt. Die enzymhistochemische Reaktion erfolgte durch Auftragen von 100 µl Diaminobenzidin in DAKO Substratpuffer. Nach 10 min wurde die Lösung dekantiert und die Schnitte zweimal mit H<sub>2</sub>O gespült.

Für die Hämatoxylin-Kerngegenfärbung wurden die Schnitte 30 s in saurem Hämalaun (frisch filtriert) gefärbt, kurz in HCl-Alkohol differenziert und in Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Paraffinschnitte in ddH<sub>2</sub>O gespült und je 5 min in 50%, 70%, 90% und 100% EtOH dehydriert. Um die Schnitte einzudecken, wurden sie für 10 min in Isopropanol/Xylol und 2x 10 min in Xylol inkubiert und mit Eukitt eingedeckt.

#### b) Fluoreszenz-Markierung

Nach Spülen mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) mit 2% Milchpulver wurden die Objektträger liegend weiterbehandelt. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren wurde bei RT 20 min mit 1:5 verdünntem ZS in PBS/BSA (jeweils 200 µl) inkubiert. Das ZS wurde dekantiert und die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte in BSA/PBS ü. N. bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) mit 2% Milchpulver 3x 5 min gewaschen und 2 h bei RT mit den speziesspezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern und DAPI (0,5 µg/ml, zur Darstellung der Kerne) inkubiert. Nach 3x 5 min Spülen mit 0,05 M Trispuffer (pH 7,6) wurden die Schnitte mit *Aqua Poly Mount* eingedeckt.

### 7.4.11 Immunzytochemische Analyse von Zellkulturen

Für immunzytochemische Anfärbungen wurden COS7 Zellen und hippokampale Neurone auf Glas-Deckgläschen (12 mm Durchmesser, Menzel-Gläser) kultiviert. Die Zellen wurden bei RT mit 4% PFA 15 min fixiert und 3x kurz in PBS gewaschen. Anschließend wurde durch Inkubation mit 0,1% Triton-X100/PBS 1 min permeabilisiert und erneut 3x kurz in PBS gewaschen. Um überschüssige Bindungsstellen abzusättigen wurden die Zellen 30 min in PBS mit 1% BSA, 2% FCS inkubiert. Die Antikörper wurden in PBS mit 0,1% BSA, 0,2% FCS verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x 5 min waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit speziesspezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern und DAPI (0,5 µg/ml, zur Darstellung der Kerne) im Dunkeln 1 h bei RT (in PBS mit 0,1% BSA, 0,2% FCS). Danach wurde erneut 3x 5 min in PBS gewaschen und die Deckgläschen mit *Aqua Poly Mount* eingedeckt.

## 7.5 Detektion von mRNA mittels *in situ* Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH) wurde mit nicht-radioaktiv markierten RNA Sonden auf 14 µm Kryostatschnitten (s. 7.4.4) unter RNase freien Bedingungen durchgeführt.

### 7.5.1 Sondenherstellung

ISH-Sonden besitzen die exakt komplementäre Sequenz zu den zu detektierenden mRNAs und werden durch RNA-Polymerasen synthetisiert. Zur Herstellung der Sonden wurden Plasmide verwendet, bei denen die DNA-Matrize von zwei verschiedenen RNA-Polymerase-Promotoren flankiert wird.

### 7.5.2 Restriktionsverdau zur Linearisierung der Plasmide

Vom jeweiligen Plasmid wurden 5-10 µg mit 20 U des entsprechenden Enzyms in einem 100 µl Ansatz für 2 h verdaut. Anschließend wurde die linearisierte DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt (s 7.1.13 und 7.1.14).

### 7.5.3 *In vitro* Transkription zur Markierung der Sonden

Zur Markierung der RNA-Sonden wurde bei der Synthese ein Nukleotid-Mix verwendet, der an UTP gekoppeltes Digoxigenin enthält. Standardreaktionen fanden in einem Volumen von 20 µl statt.

4 µl	linearisierte DNA (250 ng/µl)
6.5 µl	RNAse freies ddH <sub>2</sub> O
4 µl	Transkriptions-Puffer (5x)
2 µl	DTT (100 mM)
2 µl	10x DIG-Mix (10 mM A,C,G, 6.5 mM U, 3.5 mM DIG-UTP)
0.5 µl	RNAsin (40 U/µl)
1 µl	T7/T3/Sp6 RNA-Polymerase

Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurde zum Abstoppen der Reaktion, sowie zum Entfernen der DNA 2 µl RQ1-DNAse zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Inhibierung der DNAse wurde danach 1 µl 0.5 M EDTA pH 8 zugegeben. Anschließend wurde 1 µl der Reaktion mit 2 µl RNA-Probenpuffer und 12 µl RNAse freiem ddH<sub>2</sub>O versetzt und die RNA durch eine Inkubation von 1 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde die RNA-Sonde mit einem 1.5% Agarosegel analysiert.

### 7.5.4 Hydrolyse der cRNA

Einige Sonden wurden durch alkalische Hydrolyse auf ca. 200 bp verkürzt. Dafür wurden auf Eis der *in vitro* Transkriptions-Ansatz mit 73 µl ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und 5 µl 2 N NaOH (f.c. 0.1 N NaOH) zugegeben. Die Dauer der alkalischen Hydrolyse wurde durch folgende Formel bestimmt:

$$t [\text{min}] = LS - LE / K \times LS \times LE$$

mit

- K = 0.1101 kb/min
- LS = Anfangslänge in kb
- LE = Endlänge in kb (normalerweise 0,2 kb)

Durch die Zugabe von 5 µl 2 N HCl wurde die Reaktion abgestoppt und neutralisiert.

## 7.5.5 Aufreinigung der RNA-Sonden

Die RNA-Sonden wurden nach der *in vitro* Transkription bzw. der Hydrolyse aufgereinigt und von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Dafür wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

### a) Aufreinigung mittels Gelfiltration

Die Sonden wurden mit Bio-Gel P30 Säulen (BioRad) nach Angaben des Herstellers von allen Nukleotiden bis zu 20 Basen getrennt. Das Volumen nicht hydrolysierter Sonden wurde dafür mit RNase freiem ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt.

### b) Aufreinigung mittels Ethanol-fällung

Der Reaktionsansatz der *in vitro* Transkription wurde mit RNase freiem ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) sowie 1 µl *Pellet Paint* zugegeben und gemischt. Danach wurde 330 µl 100% EtOH zugegeben, erneut gemischt und der Ansatz anschließend bei -20°C für 1-2 h inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min wurde das RNA-Pellet mit 80% EtOH gewaschen und nach dem Lufttrocknen in 50 µl RNase freiem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. 5 µl wurden wie unter 7.1.13 beschrieben analysiert. Die Sonden wurden in einer 1:20 Verdünnung in Hybridisierungspuffer bei -20°C gelagert.

## 7.5.6 Chromogene *in situ* Hybridisierung (CISH)

Es wurden RNase freie Lösungen und RNase freie, verschließbare Glasküvetten verwendet. Die Kryostatschnitte wurden 20 min bei RT aufgetaut, 5 min in PBS gewaschen und anschließend acetyliert. Dazu wurde 5 min in 0.1 M Triethanolamin, dann 10 min in frisch angesetzter Acetylierungslösung (200 ml 0.1 M Triethanolamin, 500 µl Essigsäureanhydrid) inkubiert und schließlich dreimal 5 min in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden in eine verschließbare Kammer gelegt, die mit 5x SSC/ 50% Formamid angefeuchtet war. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde mit 300 µl Hybridisierungspuffer 1-2 h bei RT prähybridisiert. Nach Entfernen des Hybridisierungspuffers wurde 100-200 µl der in Hybridisierungspuffer verdünnten Sonden (ca. 100 ng cRNA) auf die Schnitte aufgetragen. Auf die Objektträger wurde Parafilm gelegt und zur Hybridisierung ü. N. bei 65°C in der angefeuchteten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Glasküvetten bei RT zweimal für 10 min in 2x SSC, zweimal für 10 min bei 68°C in vorgewärmten 0,2x SSC und dann bei RT 5 min in 0,2x SSC gewaschen, um nicht gebundene Sonden zu entfernen. Die Schnitte wurden 5 min in Maleinsäure Puffer äquilibriert und 1 bei RT in Maleinsäure Puffer mit 1% (w/v) Milchpulver geblockt. Die Objektträger wurden für die Antikörperinkubation zur Detektion der markierten RNA:RNA-Hybride erneut in die feuchte Kammer gelegt. Nach Auftragen von 100-200 µl des in Maleinsäure Puffer mit 1% (w/v) Milchpulver 1:2000 verdünnten AP-gekoppelte anti-dig Antikörpers wurde 1 bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal 30 min in Maleinsäure Puffer gewaschen und 5 min im Färbepuffer äquilibriert. In frisch angesetzter Färbelösung (60 ml Färbepuffer, 270 µl NBT-Stammlösung, 210 µl BCIP-Stammlösung) wurden die Schnitte in einer Standküvette im Dunkeln inkubiert bis die gewünschte Signalstärke erreicht wurde (2-24 h). Die Reaktion wurde in TE abgestoppt, die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

## 7.6 Western Blot Analyse

### 7.6.1 Herstellung von Proteinextrakten

Proteinextrakte von Organen sowohl von transgenen als auch von Wildtyp Mäusen wurden hergestellt. Dazu wurden die Gewebe präpariert und mit Hilfe eines Ultraturax in RIPA Puffer, pH 7,4 mit einer Proteaseinhibitormischung (*Complete tablets*, Roche Diagnostis, Penzberg), homogenisiert. Die erhaltenen Extrakte wurden dreimal für jeweils 10 s sonifiziert, um genomische DNA zu scheren. Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis. Das

erhaltene Proteinhomogenat wurde 30 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert. Von einem Aliquot wurde der Proteingehalt der Probe bestimmt (s 7.6.2).

## 7.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Gehirnhomogenate wurde nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt. Dazu wurden 1:5 verdünnte Proteinhomogenate mit dem BioRad *DC Protein Assay Kit* nach Angaben des Herstellers analysiert. Die OD650 wurde in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Dynex Technologies., Chantilly, Virginia, USA) gemessen und die Konzentration des Proteingehaltes mit Hilfe einer Eichgerade (BSA als Standard) bestimmt.

## 7.6.3 Probenvorbereitung

Zur Durchführung der *Western Blot* Analyse wurden die Proteinproben auf 1,5-2,5 µg/µl mit 4x Ladepuffer (80 mM Tris/HCl, 40% (w/v) Glycerin, 8% (v/v) 0,4% Bromphenolblau in EtOH, 4% (w/v) SDS, 8% (v/v) β-Mercaptoethanol (zur Reduzierung der Disulfidbrücken in Proteinen) (Laemmli, 1970)) und ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proteinproben für 10 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis abgeschreckt, kurz zentrifugiert und 15-30 µg in eine Tasche des Gels aufgetragen.

## 7.6.4 Gelelektrophorese und Elektrotransfer

Proteine können nach ihrer molaren Masse mit der Methode der SDS Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Es wurden Polyacrylamid-Gele (Angaben für zwei 0,75 mm Gele) mit einem 4,9%igen Sammelgel (0,67 ml Acrylamid (30% (w/v)), Bisacrylamid (0,8% (w/v))-Mischung, 0,5 ml Tris/HCl (1 M, pH 6,8), 2,7 ml H<sub>2</sub>O, 40 µl SDS (10% (w/v) in H<sub>2</sub>O), 4 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin und 40 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10% (w/v) in H<sub>2</sub>O) und einem 8%igen Trenngel (2,7 ml Acrylamid; Bisacrylamid-Mischung; 3,75 ml Tris/HCl (1 M, pH 8,8), 3,414 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl SDS (10% (w/v) in H<sub>2</sub>O), 6 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin und 30 µl APS (10% (w/v) in H<sub>2</sub>O) verwendet. Als Protein-Größenmarker wurde der *Precision Plus Protein Dual Color Standard* Marker (Biorad) verwendet. Die aufgetragenen Proben wurden elektrophoretisch (Laemmli, 1970) für 1 h bei 15 mA konstantem Strom pro Gel in Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 125 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 6,8) aufgetrennt und bei 30 V für einer Stunde bei 4°C in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin) auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Einsatz für 30 s in 100% Methanol aktiviert und danach kurz in Transfer-Puffer gewaschen. Die Membranen wurden in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und auf einem Taumelroller inkubiert. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 1 h in TBS-T mit Milchpulver (5% (w/v)). Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4°C mit 5 ml Antikörperlösung in TBS-T mit Milchpulver (5% (w/v)) inkubiert. Nach dreimaligem Spülen und viermaligem Waschen für 10 min mit TBS-T wurden die Membranen für 1½ h mit dem Sekundärantikörper in 5 ml TBS-T auf dem Taumelroller bei RT inkubiert. Nach Waschen in TBS-T (4 x 10 min) wurden die Proteinbanden mit Hilfe des ECL-Systems (*Enhanced Chemiluminescent Detektionssystem*, Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers auf einem Film visualisiert. Die Membranen wurden in Klarsichtfolie verpackt, und der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) wurde je nach Notwendigkeit bis zu zehn Minuten in einer Filmkassette belichtet.

Zum erneuten Detektieren mit einem weiteren primären Antikörper wurde die PVDF-Membran in einem Stripping-Puffer für 1 h bei 65°C behandelt, 2x 20 min mit TBS-T bei RT gewaschen und es wurde, wie oben beschrieben, mit dem Blocken der Membran fortgeföhren.

## 7.7 Elektrophysiologie

### 7.7.1 Präparation von lebenden Gehirnschnitten

Die Mäuse wurden mit Diethylether betäubt und durch zervikale Dyslokation getötet. Das Gehirn wurde schnell herauspräpariert und sofort in mit Karbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begaste, eiskalte Präparierlösung (118 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM Glucose, pH 7,4) überführt und 300-400 µm dicke frontale Vibratomschnitte (752M, Capden Instruments, Loughborough, UK) der gewünschten Bereiche hergestellt. Zur Lagerung wurden die einzelnen Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel in ein Vorratsgefäß mit Nylonnetzboden mit auf 35°C erwärmter, karbogenbegaster Präparierlösung überführt und für mindestens 60 min inkubiert. Die Schnitte wurden für das Aussaugen von Zellen (s 7.1.18) oder für elektrophysiologische Untersuchungen (s 7.7.2) verwendet.

### 7.7.2 Extrazelluläre Messung von hippokampalen Schnitten

In Kollaboration mit PD Dr. med. Weiqi Zhang wurden Mäuse im Alter von 9-11 Wochen untersucht. Die Kapillaren wurden aus Borosilikatglas (GC150TF-10, Harvard Apparatus, Holliston, USA) mit einem horizontalen Elektrodenziehgerät (P-80/PC, Sutter Instrument Co., Novato, USA) gezogen und mit Präparierlösung befüllt. Stimulationselektroden aus nichtisoliertem, rostfreiem Draht (50 µm Durchmesser, AM-Systems) wurden verwendet. Getriggert von einem Stimulator (Grass S88) wurden mittels einer photoelektrischen Stimulus Isolationseinheit (Grass PSIU6) Stimuli generiert und die extrazellulären Feldpotentiale mit einem speziell angefertigten DC-Verstärker aufgenommen. Die Daten wurden mit *DigiData* (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) digitalisiert und erste Analysen mit *Clampfit* 9.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) durchgeführt. Zur Erzeugung von extrazellulären exzitatorischen Feldpotentialen (fEPSPs; *field excitatory postsynaptic potentials*) wurde die Stimulationselektrode in das *stratum radiatum* an der CA3/CA1 Grenze platziert, um die Schaffer-Kollateralen zu stimulieren. Die Messpipette wurde ebenfalls in das *stratum radiatum* der CA1-Region platziert. Die Größe der fEPSPs wurde als Steigung zwischen 20-80% der ansteigenden Phase gemessen. Für das Input/Output Verhältnis wurden fEPSPs mit einem 0,1 ms Stimulus bei 0,25 Hz erzeugt. Der Mittelwert von 4 aufeinanderfolgenden Messungen gebildet. Die fEPSPs Kurven wurden gegen die Stimulus-Intensität (10-150 µA) aufgetragen. Die Faszilitation gepaarter Pulse (PPF; *Paired-pulse facilitation*) wurde bei verschiedenen Interstimulusintervallen (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 und 200 ms) gemessen und als Verhältnis der Amplituden von der zweiten fEPSP zur ersten fEPSP Kurve aufgetragen. Hierbei wurden die Stimuli wieder bei 0,25 Hz erzeugt und der Mittelwert von 4 aufeinanderfolgenden Messungen gebildet. Zur Analyse der LTP (Langzeit Potenzierung; *long-term potentiation*) wurde alle 20 s für 5 min die basale Transmission gemessen. LTP wurde mittels 4 Pulsserien im Abstand von 20 s induziert, jede Serie bestand aus einer 100 Hz Stimulierung für 1 s. Nach den Pulsserien wurde dann alle 20 s für 60 min gemessen. Als LTP wurde der Mittelwert der Messungen zwischen 50 bis 60 min nach der Induktion verwendet.

## 8 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Toluidin-Salz
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	humanes Zytomegalievirus
ddH <sub>2</sub> O	entsalztes destilliertes Wasser
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dig	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DLM	dendritisches Lokalisierungs-Motiv
DTT	1,4-Dithiotreitol
E	Embryonaltag
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	grünes fluoreszentes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
EM	Elektronenmikroskopie
EtOH	Ethanol
f.c.	finale Konzentration ( <i>final concentration</i> )
FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HRP	Meerrettich Peroxidase ( <i>horse-radish peroxidase</i> )
HS	Pferdeserum ( <i>horse serum</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KO	knock out
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase-Gen in <i>E. coli</i>
LB	Luria Bertoni; Medium für Bakterien
LoxP	Locus of crossover aus dem Bakteriophagen P
M	Molar = mol/l
MCS	Mehrfachklonierstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
mRNA	Boten ( <i>messenger</i> )-RNA
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NeuN	Antigen in neuronalen Nuklei
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	Protein-kodierende Sequenz ( <i>open reading frame</i> )
P	Postnataltag
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphat-buffered saline</i> )

---

PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
PV	Parvalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Zitratpuffer
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tg/tg	Transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylenmonosorbitanlaurinsäure
U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
ZS	Ziegenserum
ZNS	zentrales Nervensystem

Die in dieser Arbeit verwendeten Dimensionen wurden dem Internationalen Einheitensystem (SI) entsprechend angegeben. Soweit sinnvoll und vorhanden sind in dieser Arbeit deutsche Fachbegriffe verwendet worden. Sofern keine geeigneten deutschen Fachbegriffe genutzt werden konnten oder deutsche Begriffe keine eindeutige Bezeichnung darstellen, wurden englische Fachbegriffe verwendet. Diese sind, ebenso wie alle anderen Begriffe aus Fremdsprachen, kursiv geschrieben. Markenprodukte werden ohne Kennzeichnung als solche bezeichnet.

## 9 LITERATUR

- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE, Jr., Jones EG (1995): Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 52:258-266.
- Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman CA, Bunney WE, Jr., Jones EG (1996): Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J Neurosci* 16:19-30.
- Anton ES, Ghashghaei HT, Weber JL, McCann C, Fischer TM, Cheung ID, Gassmann M, Messing A, Klein R, Schwab MH, Lloyd KC, Lai C (2004): Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 7:1319-1328.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R (2008): Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Babovic D, O'Tuathaigh CM, O'Connor AM, O'Sullivan GJ, Tighe O, Croke DT, Karayiorgou M, Gogos JA, Cotter D, Waddington JL (2008): Phenotypic characterization of cognition and social behavior in mice with heterozygous versus homozygous deletion of catechol-O-methyltransferase. *Neuroscience* 155:1021-1029.
- Bao J, Lin H, Ouyang Y, Lei D, Osman A, Kim TW, Mei L, Dai P, Ohlemiller KK, Ambron RT (2004): Activity-dependent transcription regulation of PSD-95 by neuregulin-1 and Eos. *Nat Neurosci* 7:1250-1258.
- Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA (2003): Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161:1133-1141.
- Bartos M, Vida I, Frotscher M, Meyer A, Monyer H, Geiger JR, Jonas P (2002): Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13222-13227.
- Bartos M, Vida I, Jonas P (2007): Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* 8:45-56.
- Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G (1996): All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271:5251-5257.
- Benes F, Berretta S (2001): GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 25:1-27.
- Berger MB, Mendrola JM, Lemmon MA (2004): ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett* 569:332-336.
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bjarnadottir M, Misner DL, Haverfield-Gross S, Bruun S, Helgason VG, Stefansson H, Sigmundsson A, Firth DR, Nielsen B, Stefansdottir R, Novak TJ, Stefansson K, Gurney ME, Andresson T (2007): Neuregulin1 (NRG1) signaling through Fyn modulates NMDA receptor phosphorylation: differential synaptic function in NRG1+/- knock-outs compared with wild-type mice. *J Neurosci* 27:4519-4529.
- Boucher AA, Arnold JC, Duffy L, Schofield PR, Micheau J, Karl T (2007): Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of Delta9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 192:325-336.
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Muller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA (2008): Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59:581-595.

- Britto JM, Lukehurst S, Weller R, Fraser C, Qiu Y, Hertzog P, Busfield SJ (2004): Generation and characterization of neuregulin-2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24:8221-8226.
- Buonanno A, Fischbach GD (2001): Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11:287-296.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S (2003): An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12:541-552.
- Buzsaki G, Draguhn A (2004): Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926-1929.
- Cardno AG, Gottesman, II (2000): Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* 97:12-17.
- Carlsson M, Carlsson A (1990): Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 13:272-276.
- Caroni P (1997): Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71:3-9.
- Carpenter G (2003): ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 284:66-77.
- Carraway KL, 3rd, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai C (1997): Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387:512-516.
- Chang Q, Fischbach GD (2006): An acute effect of neuregulin 1 beta to suppress alpha 7-containing nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 26:11295-11303.
- Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB (1992): The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9:929-942.
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003): The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284:54-65.
- Citri A, Yarden Y (2006): EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:505-516.
- Corfas G, Roy K, Buxbaum JD (2004): Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 7:575-580.
- Craig AM, Kang Y (2007): Neurexin-neuroigin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 17:43-52.
- DeFelipe J (1997): Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14:1-19.
- Di Segni A, Farin K, Pinkas-Kramarski R (2008): Identification of nucleolin as new ErbB receptors- interacting protein. *PLoS ONE* 3:e2310.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988): The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santiestevan E, Nishi E, Klagsbrun M (1999): Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 18:2607-2615.
- Elenius K, Corfas G, Paul S, Choi CJ, Rio C, Plowman GD, Klagsbrun M (1997): A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem* 272:26761-26768.
- Escher P, Lacazette E, Courtet M, Blindenbacher A, Landmann L, Bezakova G, Lloyd KC, Mueller U, Brenner HR (2005): Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors. *Science* 308:1920-1923.
- Falls DL (2003): Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14-30.
- Falls DL, Rosen KM, Corfas G, Lane WS, Fischbach GD (1993): ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-815.
- Ferguson KM, Darling PJ, Mohan MJ, Macatee TL, Lemmon MA (2000): Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors. *Embo J* 19:4632-4643.

- Fernandez PA, Tang DG, Cheng L, Prochiantz A, Mudge AW, Raff MC (2000): Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron* 28:81-90.
- Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA, Wigler M (1988): Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8:2159-2165.
- Fiering S, Epner E, Robinson K, Zhuang Y, Telling A, Hu M, Martin DI, Enver T, Ley TJ, Groudine M (1995): Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev* 9:2203-2213.
- Fisahn A, Neddens J, Yan L, Buonanno A (2008): Neuregulin-1 Modulates Hippocampal Gamma Oscillations: Implications for Schizophrenia. *Cereb Cortex*.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marin O (2004): Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.
- Fox IJ, Kornblum HI (2005): Developmental profile of ErbB receptors in murine central nervous system: implications for functional interactions. *J Neurosci Res* 79:584-597.
- Frenzel KE, Falls DL (2001): Neuregulin-1 proteins in rat brain and transfected cells are localized to lipid rafts. *J Neurochem* 77:1-12.
- Freund TF, Buzsaki G (1996): Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Freund TF, Katona I (2007): Perisomatic inhibition. *Neuron* 56:33-42.
- Fuchs EC, Zivkovic AR, Cunningham MO, Middleton S, Lebeau FE, Bannerman DM, Rozov A, Whittington MA, Traub RD, Rawlins JN, Monyer H (2007): Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior. *Neuron* 53:591-604.
- Fuentealba P, Begum R, Capogna M, Jinno S, Marton LF, Csicsvari J, Thomson A, Somogyi P, Klausberger T (2008): Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* 57:917-929.
- Garcia RA, Vasudevan K, Buonanno A (2000): The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3596-3601.
- Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G (1995): Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378:390-394.
- Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995): Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269-287.
- Geiger JR, Lubke J, Roth A, Frotscher M, Jonas P (1997): Submillisecond AMPA receptor-mediated signaling at a principal neuron-interneuron synapse. *Neuron* 18:1009-1023.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995): Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193-204.
- Gerecke KM, Wyss JM, Carroll SL (2004): Neuregulin-1beta induces neurite extension and arborization in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 27:379-393.
- Gerecke KM, Wyss JM, Karavanova I, Buonanno A, Carroll SL (2001): ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are differentially expressed throughout the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* 433:86-100.
- Gerlai R, Pisacane P, Erickson S (2000): Heregulin, but not ErbB2 or ErbB3, heterozygous mutant mice exhibit hyperactivity in multiple behavioral tasks. *Behav Brain Res* 109:219-227.
- Givogri MI, Costa RM, Schonmann V, Silva AJ, Campagnoni AT, Bongarzone ER (2002): Central nervous system myelination in mice with deficient expression of Notch1 receptor. *J Neurosci Res* 67:309-320.
- Gordon JW, Ruddle FH (1983): Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* 101:411-433.
- Gottmann K (2008): Transsynaptic modulation of the synaptic vesicle cycle by cell-adhesion molecules. *J Neurosci Res* 86:223-232.

- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997): ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 16:1647-1655.
- Gu Z, Jiang Q, Fu AK, Ip NY, Yan Z (2005): Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex. *J Neurosci* 25:4974-4984.
- Gupta A, Wang Y, Markram H (2000): Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287:273-278.
- Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd (1994): Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8132-8136.
- Hahn CG, Wang HY, Cho DS, Talbot K, Gur RE, Berrettini WH, Bakshi K, Kamins J, Borgmann-Winter KE, Siegel SJ, Gallop RJ, Arnold SE (2006): Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med* 12:824-828.
- Hamori J, Lakos I, Mezey E (1980): Myelinated dendrites of Purkinje cells in deafferented cerebellar cortex. *J Hirnforsch* 21:391-407.
- Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1999): Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18:2681-2689.
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005): Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40-68; image 45.
- Horiuchi K, Zhou HM, Kelly K, Manova K, Blobel CP (2005): Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2. *Dev Biol* 283:459-471.
- Hu X, He W, Diaconu C, Tang X, Kidd GJ, Macklin WB, Trapp BD, Yan R (2008): Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *Faseb J* 22:2970-2980.
- Huang YZ, Won S, Ali DW, Wang Q, Tanowitz M, Du QS, Pelkey KA, Yang DJ, Xiong WC, Salter MW, Mei L (2000): Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron* 26:443-455.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
- Jaworski A, Burden SJ (2006): Neuromuscular synapse formation in mice lacking motor neuron- and skeletal muscle-derived Neuregulin-1. *J Neurosci* 26:655-661.
- Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX (1999): Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447:227-231.
- Junttila TT, Sundvall M, Maatta JA, Elenius K (2000): ErbB4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends Cardiovasc Med* 10:304-310.
- Kainulainen V, Sundvall M, Maatta JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K (2000): A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J Biol Chem* 275:8641-8649.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000): Principles of neural science, ed International Edition, Appleton & Lange.
- Karl T, Duffy L, Scimone A, Harvey RP, Schofield PR (2007): Altered motor activity, exploration and anxiety in heterozygous neuregulin 1 mutant mice: implications for understanding schizophrenia. *Genes Brain Behav* 6:677-687.
- Kawaguchi Y, Kondo S (2002): Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31:277-287.
- Kennedy MB (1997): The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* 20:264-268.
- Kistner U, Wenzel BM, Veh RW, Cases-Langhoff C, Garner AM, Appeltauer U, Voss B, Gundelfinger ED, Garner CC (1993): SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg-A*. *J Biol Chem* 268:4580-4583.
- Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y (1999): The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared

- coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4995-5000.
- Klausberger T, Somogyi P (2008): Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53-57.
- Komuro A, Nagai M, Navin NE, Sudol M (2003): WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem* 278:33334-33341.
- Kullmann DM, Lamsa KP (2007): Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* 8:687-699.
- Kwon OB, Longart M, Vullhorst D, Hoffman DA, Buonanno A (2005): Neuregulin-1 reverses long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 25:9378-9383.
- Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J (2007): Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 20:687-702.
- Law AJ, Kleinman JE, Weinberger DR, Weickert CS (2007): Disease-associated intronic variants in the ErbB4 gene are related to altered ErbB4 splice-variant expression in the brain in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 16:129-141.
- Law AJ, Shannon Weickert C, Hyde TM, Kleinman JE, Harrison PJ (2004): Neuregulin-1 (NRG-1) mRNA and protein in the adult human brain. *Neuroscience* 127:125-136.
- Lemke G (2006): Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 2006:pe11.
- Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y (1998): Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo J* 17:3385-3397.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005): Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312-324.
- Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R (2007): The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54:583-597.
- Ling Y, Morgan K, Kalsheker N (2003): Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1505-1535.
- Linggi B, Carpenter G (2006): ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol* 16:649-656.
- Liu Y, Ford B, Mann MA, Fischbach GD (2001): Neuregulins increase alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and enhance excitatory synaptic transmission in GABAergic interneurons of the hippocampus. *J Neurosci* 21:5660-5669.
- Loeb JA, Khurana TS, Robbins JT, Yee AG, Fischbach GD (1999): Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* 126:781-791.
- Long W, Wagner KU, Lloyd KC, Binart N, Shillingford JM, Hennighausen L, Jones FE (2003): Impaired differentiation and lactational failure of ErbB4-deficient mammary glands identify ERBB4 as an obligate mediator of STAT5. *Development* 130:5257-5268.
- Longart M, Chatani-Hinze M, Gonzalez CM, Vullhorst D, Buonanno A (2007): Regulation of ErbB-4 endocytosis by neuregulin in GABAergic hippocampal interneurons. *Brain Res Bull* 73:210-219.
- Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A (2004): Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472:156-172.
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marin O, Garel S (2006): Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125:127-142.
- Lubetzki C, Demerens C, Anglade P, Villarroya H, Frankfurter A, Lee VM, Zalc B (1993): Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6820-6824.
- Ma L, Huang YZ, Pitcher GM, Valtschanoff JG, Ma YH, Feng LY, Lu B, Xiong WC, Salter MW, Weinberg RJ, Mei L (2003): Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci* 23:3164-3175.
- Ma YJ, Hill DF, Creswick KE, Costa ME, Cornea A, Lioubin MN, Plowman GD, Ojeda SR (1999): Neuregulins signaling via a glial erbB-2-erbB-4 receptor complex contribute to

- the neuroendocrine control of mammalian sexual development. *J Neurosci* 19:9913-9927.
- Mann EO, Paulsen O (2007): Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci* 30:343-349.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004): Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Mechawar N, Lacoste B, Yu WF, Srivastava LK, Quirion R (2007): Developmental profile of neuregulin receptor ErbB4 in postnatal rat cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience* 148:126-139.
- Mei L, Xiong WC (2008): Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9:437-452.
- Meyer AH, Katona I, Blatow M, Rozov A, Monyer H (2002): In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. *J Neurosci* 22:7055-7064.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004): Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
- Minichiello L, Korte M, Wolfner D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (1999): Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24:401-414.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.
- Murai KK, Pasquale EB (2004): Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist* 10:304-314.
- Nave KA, Salzer JL (2006): Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16:492-500.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G (2001): gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294:2179-2181.
- Nicodemus KK, Luna A, Vakkalanka R, Goldberg T, Egan M, Straub RE, Weinberger DR (2006): Further evidence for association between ErbB4 and schizophrenia and influence on cognitive intermediate phenotypes in healthy controls. *Mol Psychiatry* 11:1062-1065.
- O'Tuathaigh CM, Babovic D, O'Meara G, Clifford JJ, Croke DT, Waddington JL (2007): Susceptibility genes for schizophrenia: characterisation of mutant mouse models at the level of phenotypic behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 31:60-78.
- O'Tuathaigh CM, O'Connor AM, O'Sullivan GJ, Lai D, Harvey R, Croke DT, Waddington JL (2008): Disruption to social dyadic interactions but not emotional/anxiety-related behaviour in mice with heterozygous 'knockout' of the schizophrenia risk gene neuregulin-1. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:462-466.
- Okada M, Corfas G (2004): Neuregulin1 downregulates postsynaptic GABAA receptors at the hippocampal inhibitory synapse. *Hippocampus* 14:337-344.
- Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE (1998): ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18:5042-5051.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* 19:3159-3167.
- Omerovic J, Puggioni EM, Napoletano S, Visco V, Fraioli R, Frati L, Gulino A, Alimandi M (2004): Ligand-regulated association of ErbB-4 to the transcriptional co-activator YAP65 controls transcription at the nuclear level. *Exp Cell Res* 294:469-479.
- Ozaki M, Kishigami S, Yano R (1998): Expression of receptors for neuregulins, ErbB2, ErbB3 and ErbB4, in developing mouse cerebellum. *Neurosci Res* 30:351-354.
- Ozaki M, Sasner M, Yano R, Lu HS, Buonanno A (1997): Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature* 390:691-694.
- Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y (1996): Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *Embo J* 15:2452-2467.

- Pitcher GM, Beggs S, Woo RS, Mei L, Salter MW (2008): ErbB4 is a suppressor of long-term potentiation in the adult hippocampus. *Neuroreport* 19:139-143.
- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M (1993): Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1746-1750.
- Richardson K (1960): "Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy." *Stain Technol* 35:313-323.
- Rieff HI, Raetzman LT, Sapp DW, Yeh HH, Siegel RE, Corfas G (1999): Neuregulin induces GABA(A) receptor subunit expression and neurite outgrowth in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 19:10757-10766.
- Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ, Corfas G (2000): Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* 275:10379-10387.
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G (1997): Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19:39-50.
- Rivera JF, Ahmad S, Quick MW, Liman ER, Arnold DB (2003): An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K<sup>+</sup> channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci* 6:243-250.
- Roy K, Murtie JC, El-Khodori BF, Edgar N, Sardi SP, Hooks BM, Benoit-Marand M, Chen C, Moore H, O'Donnell P, Brunner D, Corfas G (2007): Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8131-8136.
- Roysommuti S, Carroll SL, Wyss JM (2003): Neuregulin-1beta modulates in vivo entorhinal-hippocampal synaptic transmission in adult rats. *Neuroscience* 121:779-785.
- Sambrook J, Fritsch I, Maniatis T (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual.*, CSH Laboratory press.
- Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G (2006): Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* 127:185-197.
- Sawyer C, Hiles I, Page M, Crompton M, Dean C (1998): Two erbB-4 transcripts are expressed in normal breast and in most breast cancers. *Oncogene* 17:919-924.
- Schmucker J, Ader M, Brockschneider D, Brodarac A, Bartsch U, Riethmacher D (2003): erbB3 is dispensable for oligodendrocyte development in vitro and in vivo. *Glia* 44:67-75.
- Silberberg G, Darvasi A, Pinkas-Kramarski R, Navon R (2006): The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:142-148.
- Somogyi P (1977): A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 136:345-350.
- Somogyi P, Klausberger T (2005): Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9-26.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K (2002): Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:877-892.
- Stefansson H, Steinthorsdottir V, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K (2004): Neuregulin 1 and schizophrenia. *Ann Med* 36:62-71.
- Sundvall M, Korhonen A, Paatero I, Gaudio E, Melino G, Croce CM, Aqeilan RI, Elenius K (2008): Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4162-4167.
- Sweeney C, Lai C, Riese DJ, 2nd, Diamonti AJ, Cantley LC, Carraway KL, 3rd (2000): Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer. *J Biol Chem* 275:19803-19807.
- Taveggia C, Thaker P, Petrylak A, Caporaso GL, Toews A, Falls DL, Einheber S, Salzer JL (2008): Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia* 56:284-293.

- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005): Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681-694.
- Tidcombe H, Jackson-Fisher A, Mathers K, Stern DF, Gassmann M, Golding JP (2003): Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8281-8286.
- Vartanian T, Fischbach G, Miller R (1999): Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:731-735.
- Vecchi M, Baulida J, Carpenter G (1996): Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem* 271:18989-18995.
- Vogelstein B, D G (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci* 76:615-619.
- Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A (1995): Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J* 14:4267-4275.
- Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grunewald S, Scheek S, Bach A, Nave KA, Rossner MJ (2006): Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat Methods* 3:985-993.
- Wen D, Suggs SV, Karunakaran D, Liu N, Cupples RL, Luo Y, Janssen AM, Ben-Baruch N, Trollinger DB, Jacobsen VL, et al. (1994): Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. *Mol Cell Biol* 14:1909-1919.
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006): Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314:664-666.
- Williams CC, Allison JG, Vidal GA, Burow ME, Beckman BS, Marrero L, Jones FE (2004): The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol* 167:469-478.
- Wilson TW, Rojas DC, Teale PD, Hernandez OO, Asherin RM, Reite ML (2007): Aberrant functional organization and maturation in early-onset psychosis: evidence from magnetoencephalography. *Psychiatry Res* 156:59-67.
- Woo RS, Li XM, Tao Y, Carpenter-Hyland E, Huang YZ, Weber J, Neiswender H, Dong XP, Wu J, Gassmann M, Lai C, Xiong WC, Gao TM, Mei L (2007): Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54:599-610.
- Yau HJ, Wang HF, Lai C, Liu FC (2003): Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13:252-264.
- Zhang D, Sliwkowski MX, Mark M, Frantz G, Akita R, Sun Y, Hillan K, Crowley C, Brush J, Godowski PJ (1997): Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9562-9567.
- Zheng H, Koo EH (2006): The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1:5.
- Zhou W, Carpenter G (2000): Heregulin-dependent trafficking and cleavage of ErbB-4. *J Biol Chem* 275:34737-34743.
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R (2000): Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-1106.
- Ziff EB (1997): Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19:1163-1174.

## ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und mit den genannten Hilfsmitteln durchgeführt wurde.

Oktober 2008, Göttingen