

Genetische Analyse entwicklungsbiologischer Funktionen des Neuregulin-1/ErbB Signalsystems

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Anatomie

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

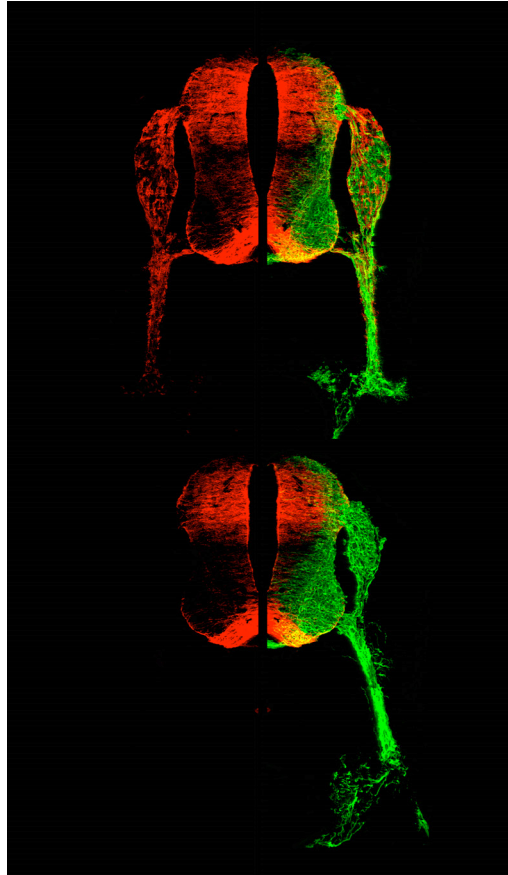
Dr. med. Stefan Britsch

geboren am 07. August 1962 in Oberndorf am Neckar, Baden Württemberg

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

eingereicht: 18. November 2003
Datum der Habilitation: 18. Oktober 2004

Gutachter:
1. Prof. Dr. B. Brand-Saberi
2. Prof. Dr. J.H. Stehle



There is no science without fancy and no art without facts.

Vladimir Nabokov

meiner Mutter, Alice
(16.08.1936 – 25.08.2003)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung – Molekulare Kontrolle der Entwicklung	5
2.	Genetische Analyse entwicklungsbiologischer Funktionen des Neuregulin-1/ErbB Signalsystems in der Maus	7
2.1	Das Neuregulin-1/ErbB Signalsystem	7
2.2	Funktionen von Neuregulin-1/ErbB2/3 Signalen während der Embryogenese der Maus	12
2.2.1	Entwicklung von Neuralleistenzellen und ihren Derivaten	12
2.2.2	Herzentwicklung	18
2.3	Funktionen des Transkriptionsfaktors Sox10 in der Entwicklung des peripheren Nervensystems	20
2.3.1	ErbB3-abhängige entwicklungsbiologische Funktionen von Sox10	22
2.3.2	Sox10 als Schlüssel molekül in der Entwicklung peripherer Gliazellen	25
2.4	NRG-1/ErbB Signalmutanten als genetische Werkzeuge	28
3.	Zusammenfassung	30
4.	Abkürzungsverzeichnis	33
5.	Literaturverzeichnis	34
6.	Anhang	42
6.1	Lebenslauf	42
6.2	Wissenschaftlicher Werdegang	45
6.3	Publikationsverzeichnis	49
7.	Ausgewählte Publikationen	52
7.1	<u>Britsch</u> et al., (1998) <i>Genes & Development</i> 12: 1825-1836	52
7.2	Woldeyesus, <u>Britsch</u> et al., (1999) <i>Genes & Development</i> 13: 2538-2548	53
7.3	<u>Britsch</u> et al., (2001) <i>Genes & Development</i> 15: 66-78	54
7.4	Özcelik, Erdmann, Pilz, Wettschurek, <u>Britsch</u> et al., (2002) <i>PNAS</i> 99: 8880-8885	55
7.5	Garratt, <u>Britsch</u> et al., (2000) <i>Bioessays</i> 22: 987-996	56
7.6	Mukouyama, Shin, <u>Britsch</u> et al., (2002) <i>Cell</i> 109: 693-705	57
8.	Danksagungen	58
9.	Erklärungen, einschließlich eidesstattlicher Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité	59

1. Einführung – Molekulare Kontrolle der Entwicklung

Die Entwicklung multizellulärer Organismen aus einer befruchteten Eizelle ist u.a. das Ergebnis von Zellproliferation und Zelluntergang (Apoptose), Zellmigration und Differenzierung. Diese Prozesse laufen räumlich und zeitlich ineinander verschränkt ab - sie müssen daher koordinier- und steuerbar sein. Organismen kontrollieren Entwicklung auf zellulärer Ebene:

- Intrinsisch, durch die zellautonome Kontrolle der Genexpression,
- Interaktiv, durch Kommunikation von Zellen untereinander oder mit ihrer extrazellulären Umgebung.

Konservierte Signalwege, wie z.B. der Wnt, Shh, TGF- β , oder Delta/Notch Signalweg, bilden dabei die molekulare Grundlage für die Kommunikation zwischen Zellen. Typischerweise nutzen Organismen während ihrer Entwicklung repetitiv eine beschränkte Zahl von Signalwegen, um verschiedene, voneinander unabhängige Entwicklungsprozesse zu steuern (Anderson and Ingham, 2003; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Ingham and McMahon, 2001; Massague et al., 2000; Peifer and Polakis, 2000). Beispielsweise steuert Shh, über seine spezifischen Rezeptoren Patched und Smoothed so unterschiedliche Vorgänge wie Musterbildung im ventralen Neuralrohr, oder die Extremitäten- und Zahnentwicklung (Ingham and McMahon, 2001).

Bestimmte extrazelluläre Signalmoleküle übertragen ihr Signal durch transmembranäre Tyrosinkinaserzeptoren (RTK) auf andere Zellen, z.B. Fibroblast growth factors (FGFs), Neurotrophine, oder Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) (Schlessinger, 2000). Ein klassischer Vertreter dieser Gruppe ist der Epidermal growth factor (EGF) und sein spezifischer Tyrosinkinaserzeptor (EGFR, HER1, oder ErbB1). RTK-vermittelte Signale steuern sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Organismus grundlegende biologische Vorgänge wie Proliferation, Survival, Migration oder Differenzierung (Schlessinger, 2000).

Viele der genannten Signalwege sind innerhalb der Evolution konserviert: so finden sich bereits in *C. elegans* und *Drosophila* EGFR Homologe, Let-23 bzw. DER. *C. elegans* besitzt einen EGF-ähnlichen Liganden, Lin-3, während in

Drosophila vier EGF-ähnliche DER Liganden, Vein, Gurken, Spitz und Argos, beschrieben wurden (Yarden and Sliwkowski, 2001). Untersuchungen in niederen Organismen können daher Modellcharakter für das funktionelle Verständnis dieser Signalwege im Säugerorganismus haben. Vielfach läßt sich jedoch während der Evolution eine funktionelle Verschiebung und eine Diversifizierung auf Molekülebene beobachten: So lassen sich in Säugern neben dem EGFR drei weitere EGFR-ähnliche RTK, ErbB2-ErbB4, und eine große Zahl EGF-ähnlicher Liganden, darunter die Familie der Neureguline (NRG), beobachten. Lin-3 ist in *C. elegans* essentiell für die Genitalentwicklung, DER in Drosophila u.a. an der Entwicklung des Insektenauges beteiligt – beide Funktionen finden keine unmittelbare Entsprechung in der Säugerentwicklung (Yarden and Sliwkowski, 2001).

Einen entscheidenden Durchbruch für das Verständnis der molekularen Kontrolle der Säugerentwicklung bedeutete daher die Möglichkeit, durch Homologe Rekombination in Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus einzelne Gene gezielt zu inaktivieren oder zu modifizieren und dadurch ihre Funktion selektiv *in vivo* analysieren zu können (Britsch et al., 2003; Muller, 1999). Mit Hilfe dieser als *Gene Targeting* bezeichneten Methode wurden bis heute ca. 3000 Gene in der Maus inaktiviert und ihre Funktion bestimmt, unter ihnen die wichtigsten Komponenten zentraler Signalübertragungssysteme (Anderson and Ingham, 2003).

In der vorgelegten Arbeit wurden mit Hilfe von *Gene Targeting* und natürlichen Mausmutationen spezifische entwicklungsbiologische Funktionen des EGF-ähnlichen Signalsystems, Neuregulin-1/ErbB und des interagierenden Transkriptionsfaktors Sox10, in der Maus aufgeklärt. Sie demonstrieren, daß das Neuregulin-1/ErbB Signalsystem und Sox10, zentrale Prozesse in der Entwicklung des peripheren Nervensystems und der Kardiogenese steuern.

2. Genetische Analyse entwicklungsbiologischer Funktionen des Neuregulin-1/ErbB Signalsystems in der Maus

2.1 Das Neuregulin-1/ErbB Signalsystem

Neureguline (NRG) sind Signalproteine, die sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Organismus Zell-Zell Interaktionen im Nervensystem, im Herz und in anderen Organen vermitteln. NRG binden an transmembranäre Tyrosinkinaserzeptoren der ErbB Familie. Über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege werden zelluläre Antworten wie z.B. Proliferation, Survival, Migration, oder Differenzierung durch NRG Signale ausgelöst (Adlkofer and Lai, 2000; Buonanno and Fischbach, 2001; Burden and Yarden, 1997; Citri et al., 2003; Falls, 2003; Garratt et al., 2000; Lemke, 1996; Yarden and Sliwkowski, 2001).

NRG wurden ursprünglich unabhängig voneinander als Faktoren beschrieben und später kloniert, die (i) ErbB2 aktivieren (Holmes et al., 1992; Peles et al., 1993; Wen et al., 1992), (ii) Gliazell Proliferation (Brockes et al., 1980; Goodearl et al., 1993; Lemke and Brockes, 1984; Marchionni et al., 1993; Raff et al., 1978), oder (iii) die Bildung von Azetylcholinrezeptoren in Muskelzellen induzieren (Falls et al., 1993; Jessell et al., 1979). Bei allen isolierten Proteinen handelte es sich um unterschiedliche Isoformen, die vom NRG-1 Gen synthetisiert werden (Falls, 2003).

NRG sind durch eine EGF-ähnliche extrazelluläre Domäne gekennzeichnet (Abb.: 2.1-1). Sie genügt für die Rezeptorbindung und Entfaltung der biologischen Aktivität von NRG. Durch alternatives Spleißen können unterschiedliche Varianten (α und β) der EGF Domäne, die sich in ihrer Rezeptor-Affinität unterscheiden, gebildet werden. Durch den Gebrauch unterschiedlicher Promotoren entstehen außerdem unterschiedliche Isoformen des NRG-1 Gens, Type I (neu differentiation factor, NDF; heregulin, HRG; acetylcholine receptor inducing activity, ARIA), Type II (glial growth factor, GGF) und Type III (sensory and motor neuron-derived factor, SMDF; cysteine-rich domain neuregulin-1, CRD-NRG-1). Die synonymen Bezeichnungen der einzelnen Isoformen spiegeln nur bedingt ihre

vorherrschende biologische Aktivität *in vivo* wider. So wird beispielsweise „glial growth factor“ Aktivität *in vivo* vor allem durch Type III und nicht durch Type II (=GGF) NRG-1 vermittelt. Type I-III Isoformen unterscheiden sich durch ihre extrazelluläre Struktur, N-terminal von der EGF Domäne. So besitzen Type I und II eine Immunglobulin-ähnliche extrazelluläre Domäne, Type I zusätzlich eine stark glykosylierte Domäne. Ausschließlich Type III NRG-1 besitzt eine Cystein-reiche Domäne (CRD) mit interner hydrophober Sequenz, die transmembranär lokalisiert ist und eine haarnadelförmige Anordnung der Type III Isoform in der Zellmembran bedingt (Abb.: 2.1-1). NRG-1 Isoformen werden als primär sezernierte oder transmembranäre Liganden gebildet. Membranassoziierte Formen können außerdem sekundär proteolytisch gespalten und Teile des Liganden extra- bzw. intrazellulär freigesetzt werden (Abb.: 2.1-1). In einer aktuellen Studie wurde jüngst *in vitro* beobachtet, daß die Interaktion der extrazellulären Domäne von Type III NRG-1 mit ErbB Rezeptoren nicht nur ein antegrades Signal (*forward-signalling*) auf die Zielzelle vermittelt, sondern außerdem ein retrogrades Signal (*back-signalling*) induziert, indem es als Folge der Rezeptorbindung zur proteolytischen Abspaltung der intrazytoplasmatischen Domäne des Liganden kommt (Abb.: 2.1-1, vergl. außerdem Kapitel 2.3.2). Diese transloziert in den Zellkern und reprimiert dort Apoptose-induzierende Gene (Bao et al., 2003).

Die einzelnen Isoformen des NRG-1 Gens unterscheiden sich ebenfalls durch ihr räumlich-zeitliches Expressionsmuster im jeweiligen Organismus: Type I NRG-1 wird vor allem während der frühen Embryogenese exprimiert, Type II findet sich vor allem im ZNS während der späten Embryogenese sowie postnatal, Type III ist neben dem ZNS vor allem in Axonen sensorischer und motorischer Neurone exprimiert (Meyer and Birchmeier, 1994; Meyer et al., 1997).

In jüngerer Zeit wurden weitere NRG identifiziert, NRG-2, -3, -4, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden und sich in ihrer Expression von NRG-1 unterscheiden (Busfield et al., 1997; Carraway et al., 1997; Higashiyama et al., 1997; Zhang et al., 1997). So ist beispielsweise NRG-4 im adulten Pankreas und Skelettmuskel jedoch nicht im Nervensystem exprimiert (Harari et al., 1999). NRG-4 Signale scheinen hier die Differenzierung von Somatostatin-produzierenden Zellen im endokrinen Pankreas zu steuern (Huotari et al., 2002).

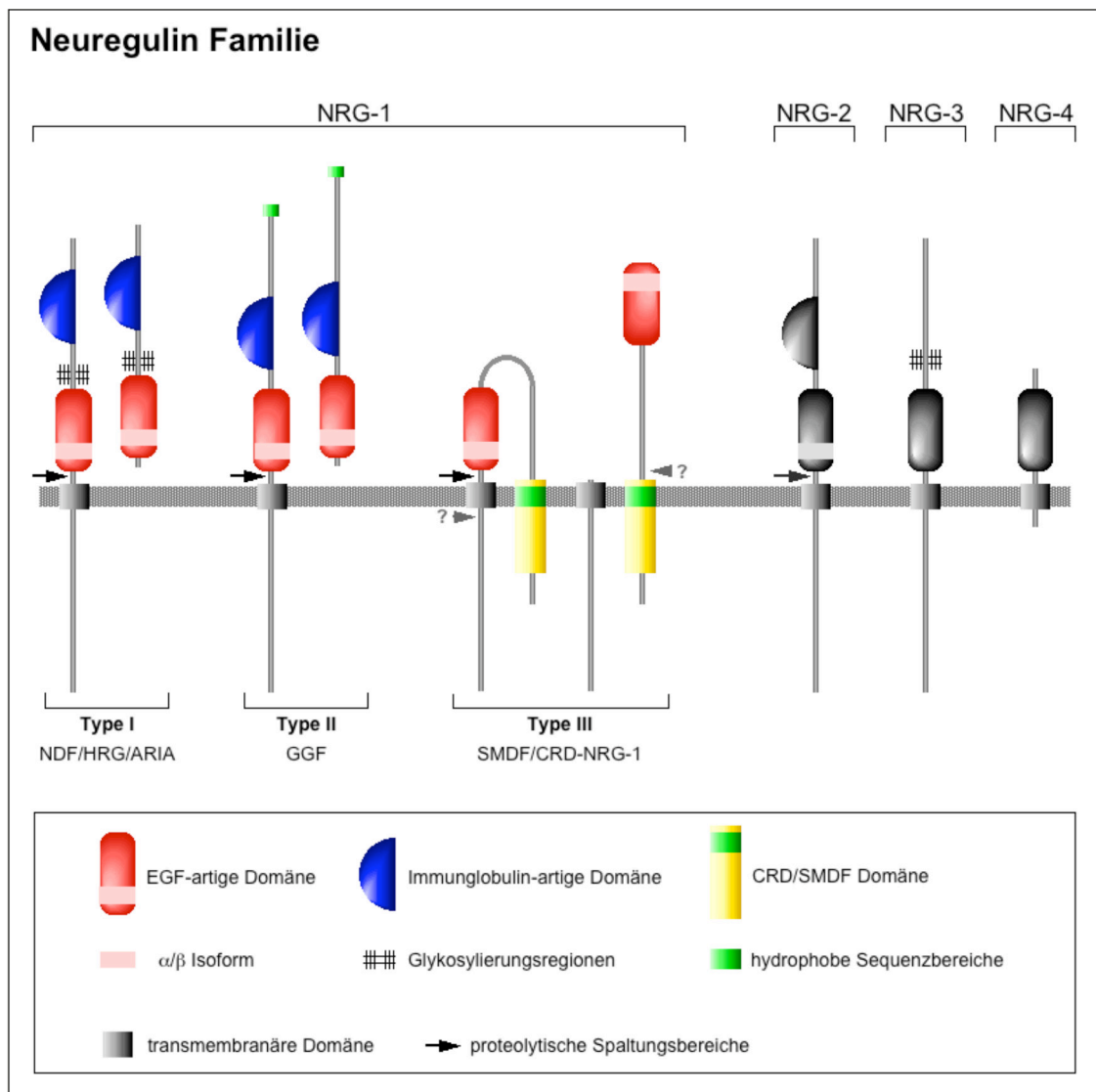


Abbildung 2.1-1: Schematische Übersicht über die Struktur der Neuregulin Liganden-Familie. NRG-1, NRG-2, NRG-3 und NRG-4 werden durch unterschiedliche Gene kodiert. Gemeinsames Merkmal aller Neureguline ist eine EGF-ähnliche, extrazelluläre Domäne. Durch alternatives Spleißen in der C-terminalen Region der EGF Domäne entstehen α und β Isoformen mit unterschiedlicher Rezeptor Affinität. Über unterschiedliche Promotoren werden verschiedene Isoformen des NRG-1 Gens gebildet: Type I (NDF, HRG, oder ARIA), Type II (GGF) und Type III (SMDF, oder CRD-NRG-1). Sie unterscheiden sich durch die Struktur ihrer N-terminalen, extrazellulären Regionen. Type I NRG-1 ist durch eine stark glykosylierte Region und eine Immunglobulin-ähnliche Domäne (Ig) charakterisiert, Type II NRG-1 besitzt zudem eine N-terminal davon lokalisierte GGF-spezifische *Kringle* Domäne (nicht dargestellt), sowie eine N-terminale hydrophobe Region, Type III NRG-1 ist durch eine Cystein-reiche Domäne (CRD, SMDf Domäne) charakterisiert. Die CRD Domäne ist durch eine hydrophobe Region transmembranär lokalisiert, wodurch eine haarnadelförmige Anordnung von Type III NRG-1 in der Zellmembran entsteht. Nach proteolytischer Spaltung im Bereich der juxtamembranären Domäne kann ein membran-assoziiertes Ligand in reverser Orientierung gebildet werden. NRG-1 Isoformen werden als primär sezernierte, oder membrangebundene Liganden gebildet, transmembranäre Vorläufer können sekundär proteolytisch freigesetzt werden. Wahrscheinliche, nicht gesicherte Bereiche, in denen Neureguline proteolytisch gespalten werden, sind ebenfalls markiert. NRG-2 besitzt eine ähnliche Struktur wie Ig-haltige Isoformen von NRG-1. Für NRG-3 und -4 sind keine α und β Isoformen nachweisbar. NRG-4 unterscheidet sich am stärksten von den übrigen Neuregulinen, es besitzt lediglich eine extrazelluläre EGF-ähnliche Domäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne. Weitere Details werden im Text dargestellt.

NRG übertragen ihre Signale mit Hilfe von ErbB Rezeptoren auf Zielzellen. Die Familie der ErbB Tyrosinkinaserzeptoren umfaßt vier Mitglieder, den EGF-Rezeptor (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Alle ErbB Rezeptoren besitzen einen einheitlichen Aufbau, der aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einfachen, transmembranären Domäne und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne besteht. Die Bindung eines spezifischen Liganden führt zur Homo- (z. B. ErbB1/ErbB1) oder Heteromerisierung (z.B. ErbB2/ErbB3) von ErbB Rezeptoren (Abb.: 2.1-2). In der Folge kommt es zur Tyrosinkinaseaktivierung und zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne, die als Bindungsstellen für intrazelluläre Signalübertragungsmoleküle wie z. B. grb2, grb7, PLC γ , shc oder p85 dienen (Buonanno and Fischbach, 2001; Citri et al., 2003; Falls, 2003; Schlessinger, 2000; Yarden and Sliwkowski, 2001).

Eine Sonderstellung unter den ErbB Rezeptoren nimmt ErbB2 ein: Trotz intensiver Suche wurde bisher kein Faktor identifiziert, der direkt an diesen Rezeptor bindet und die tyrosinspezifische Phosphorylierung von ErbB2 induziert. Verschiedene Liganden können jedoch *indirekt* die Phosphorylierung von ErbB2, d.h. die ErbB2 vermittelte Signalübertragung auslösen. So bindet z. B. Neuregulin-1 mit hoher Affinität direkt an ErbB3 und ErbB4 (Carraway et al., 1994; Plowman et al., 1993; Tzahar et al., 1994). Dies induziert die schnelle tyrosinspezifische Phosphorylierung von ErbB2 in Zellen, die ErbB3 oder ErbB4 koexprimieren (Carraway and Cantley, 1994; Peles et al., 1993; Sliwkowski et al., 1994; Wallasch et al., 1995). Ähnliches wird bei Liganden des EGF-Rezeptors beobachtet, die zwar direkt an den EGF-Rezeptor jedoch nicht an den ErbB2 Rezeptor binden, aber Autophosphorylierung von ErbB2 induzieren, wenn beide Rezeptoren in der gleichen Zelle koexprimiert werden (King et al., 1988). Diese *in vitro* Beobachtungen deuteten schon früh auf eine zentrale Rolle von ErbB2 als Korezeptor in der Übertragung von Signalen hin, die durch die direkte Bindung eines spezifischen Liganden an EGF-, ErbB3- oder ErbB4 Rezeptoren ausgelöst werden.

Wesentlich für das Verständnis der biologischen Funktionen des NRG-1/ErbB Signalsystems war die Analyse von Mäusen mit gezielten Mutationen (*knockout* Mäuse) in den einzelnen Rezeptor- und Liganden-Genen. In den vorgestellten

Arbeiten (Britsch et al., 2001; Britsch et al., 1998; Ozcelik et al., 2002; Woldeyesus et al., 1999), sowie in weiteren Arbeiten aus der Gruppe von Frau Prof. C. Birchmeier und anderen Laboren (Übersichten bei: Adlkofer and Lai, 2000; Buonanno and Fischbach, 2001; Garratt et al., 2000; Garratt et al., 2003; Lemke, 1996; Olayioye et al., 2000; Yarden and Sliwkowski, 2001) wurde gezeigt, daß NRG-1/ErbB Signale essentielle Funktionen bei der Steuerung der Entwicklung des PNS und des Herzens übernehmen. Die genetische Analyse in der Maus konnte außerdem belegen, daß funktionelle NRG-1 Rezeptoren *in vivo* Heteromere sind, wobei während der Embryogenese NRG-1 Signale im PNS durch ErbB2/ErbB3, im Herz durch ErbB2/ErbB4 Heterodimere übertragen werden.

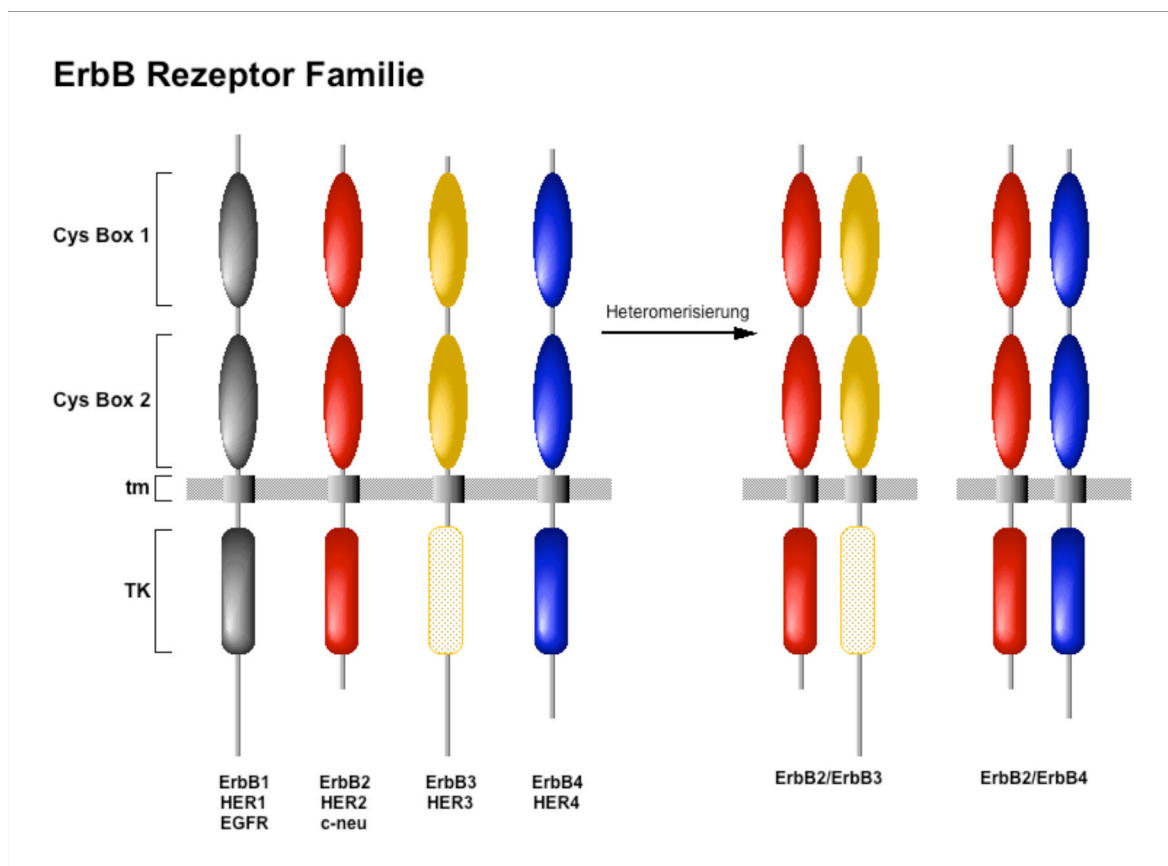


Abbildung 2.1-2: Schematische Struktur der ErbB Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie. Dargestellt sind der Epidermal growth factor receptor (EGFR, ErbB1, oder HER1) und die drei Neuregulin-1 Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4. ErbB Rezeptoren besitzen einen einheitlichen Aufbau aus jeweils zwei Cystein-reichen extrazellulären Domänen (Cys Box 1 und 2), einer transmembranären Domäne (tm) und einer intrazytoplasmatischen Tyrosinkinase Domäne (TK). Beachte, daß ErbB3 im Gegensatz zu ErbB2 und ErbB4 keine biologisch relevante Tyrosinkinase Aktivität besitzt. Durch Heteromerisierung entstehen funktionelle Neuregulin-1 Rezeptoren (rechte Bildhälfte), wobei ErbB2/ErbB3 Heteromere im PNS, ErbB2/ErbB4 Heteromere u.a. im Herz Neuregulin-1 Signale übertragen.

2.2 Funktionen von Neuregulin-1/ErbB2/3 Signalen während der Embryogenese der Maus

2.2.1 Entwicklung von Neuralleistenzellen und ihren Derivaten

Neuralleistenzellen (NCC) stellen eine stammzellartige, undifferenzierte Zellpopulation dar, die während der Embryogenese nur transient in Erscheinung tritt. NCC entwickeln sich aus dem primitiven Neuralrohrreithel am Übergang der Neuralfalteln in das nicht-neurale Ektoderm. Während ihrer Bildung lösen sich NCC aus dem epithelialen Neuralrohrverband und wandern als mesenchymartige Einzelzellen (*epithelio-mesenchymale Transition*) entlang charakteristischer Wege durch den Embryo zu ihren Zielstrukturen, wo sie sich in ihre definitiven Zellschicksale differenzieren (Abb.: 2.2.1-1).

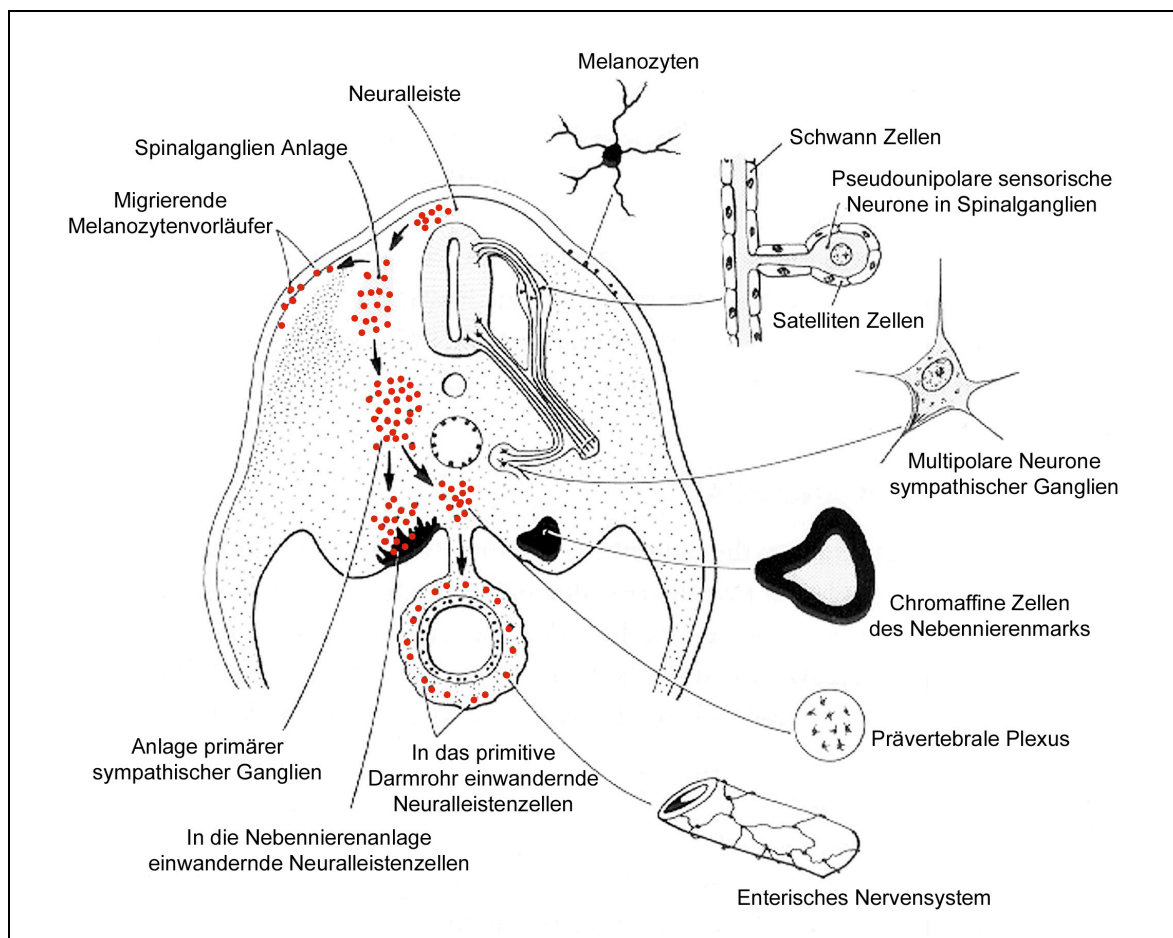


Abb. 2.2.1-1: Halbschematischer Querschnitt durch einen Wirbeltierembryo auf Höhe der Nebennierenanlage. In der linken Bildhälfte sind Migrationswege von undifferenzierten NCC und die Besiedlung von Organanlagen während der Neuralleistenzellentwicklung dargestellt. In der rechten Bildhälfte sind Neuralleistenzellderivate dargestellt (Nach Carlson, *Patten's Foundations of Embryology*, 6th edition 1996).

Wenngleich NCC als eigenständige embryonale Struktur nur passager in Erscheinung treten, sind sie von außerordentlich großer Bedeutung für die Entwicklung des Embryos, da sich aus NCC nahezu sämtliche Strukturen des peripheren Nervensystems (PNS) differenzieren: Sympathisches (SNS) und parasympathisches Nervensystem (PSNS), enterisches Nervensystem (ENS), sensorische Spinalganglienzellen, Mechanorezeptoren (*Merkel* Zellen) der Haut, sowie die gesamte periphere Gliazellpopulation (d.h. Schwannzellen im Bereich peripherer Nerven und Satellitenzellen im Bereich von sensorischen und autonomen Ganglien). NCC tragen außerdem zur Bildung von Melanozyten und von Binde- und Stützgeweben im Bereich des Kopfes bei (Halata et al., 2003; Le Douarin and Kalcheim, 1999; Szeder et al., 2003).

Die Entwicklung von NCC ist also u. a. durch Prozesse wie Zellproliferation, Zellmigration, Determinierung alternativer Zellschicksale oder zelluläre Differenzierung gekennzeichnet. Die molekularen Steuerungsmechanismen, welche diesen Prozessen zugrunde liegen wurden in den vergangenen Jahren intensiv beforscht (Anderson et al., 1997). So wurde z.B. in jüngeren Untersuchungen gezeigt, daß die Festlegung des Zellschicksals „Neuralleistenzelle“ in prä-migratorischen NCC-Vorläuferzellen des dorsalen Neuralrohrs u.a. durch die Transkriptionsfaktoren FoxD3 und Sox9 gesteuert wird (Dottori et al., 2001; Spokony et al., 2002). Außerdem steuern Mitglieder der TGF- β Familie (BMP-2, -4, -7) die Entwicklung von NCC während unterschiedlicher Phasen ihrer Entwicklung: Einerseits sind BMP Signale essentiell für die Etablierung von Progenitorpopulationen im dorsalen Neuralrohr, aus denen sich u.a. emigrierende NCC rekrutieren. Zum anderen werden BMPs in den Zielregionen des primären SNS exprimiert und induzieren dort in NCC nach deren Ankunft die spezifische Differenzierung zu sympathischen Neuronen (Howard et al., 2000; Lee and Jessell, 1999; Reissmann et al., 1996; Schneider et al., 1999; Shah et al., 1996).

In meinen Arbeiten konnte ich zeigen, daß das NRG-1/ErbB Signalsystem zentrale Funktionen bei der Steuerung der Entwicklung von NCC besitzt: Eine der frühesten Funktionen in der Entwicklung von NCC stellt die Kontrolle der Migration von sympathogenen NCC dar. Mausembryonen mit homozygot mutiertem *erbB2*,

erbB3 oder NRG-1 Gen entwickeln eine schwere Hypoplasie des primären sympathischen Nervensystems im Bereich des Rumpfes (Britsch et al., 1998). Homozygot mutante erbB2 oder NRG-1 Embryonen sterben während der Entwicklung am Tag E10 aufgrund einer Entwicklungsstörung des Herzens, die ebenfalls NRG-1 signalabhängig ist und die im nächsten Kapitel ausführlich diskutiert wird (Britsch et al., 1998; Lee et al., 1995; Meyer and Birchmeier, 1995). Um den Einfluß von NRG-1 Signalen auf die spätere Entwicklung des sympathischen Nervensystems analysieren zu können, wurden daher Mausembryonen mit einer homozygoten Mutation des erbB3 Gens eingesetzt (Riethmacher et al., 1997). ErbB3 wird während der Embryogenese nicht im Herz exprimiert, diese Mäuse überleben daher bis zur Geburt. Allerdings setzt um den Tag E12,5 eine progrediente embryonale Letalität ein, so daß nur wenige Mutanten den Zeitpunkt der Geburt erreichen (Riethmacher et al., 1997). In erbB3 mutanten Mäusen konnte ich den totalen Verlust des Nebennierenmarks sowie einen subtotalen Verlust von prä- und paravertebralen sympathischen Ganglien beobachten. Sympathische Neurone synthetisieren bereits intraembryonal Katecholamine. Entsprechend konnte ich am Entwicklungstag E12,5 in homozygot mutanten erbB3 Embryonen eine ca. 15-fache Reduktion der Gewebe-Katecholaminspiegel nachweisen (Britsch et al., 1998). In den vergangenen Jahren wurden unterschiedliche Komponenten des Katecholaminsyntheseapparats, wie z.B. Tyrosinhydroxylase oder Dopamin- β -Hydroxylase, durch Gene targeting in der Maus inaktiviert (Thomas et al., 1995; Zhou et al., 1995). Interessanterweise zeigen diese Mäuse ein embryonales Letalitätsprofil das jenem von erbB3 Mutanten sehr ähnlich ist. Es kann daher angenommen werden, daß der intraembryonale Mangel an Katecholaminen zumindest partiell deren embryonale Letalität verursacht (Britsch et al., 1998).

Anhand von Zellproliferationsuntersuchungen, Apoptose-Assays und der systematischen Analyse der Verteilung undifferenzierter sympathogener NCC im Embryo konnten wir den zellulären Mechanismus weiter aufklären, der zu der beschriebenen Entwicklungsstörung des sympathischen Nervensystems in mutanten Tieren führt: In Mausembryonen mit Mutationen des NRG-1 Signalsystems sind sympathogene NCC nicht in der Lage, in ihre spezifischen Zielregionen (zu beiden Seiten der dorsalen Aorta) einzuwandern. Sie verharren

unmittelbar nach ihrer Bildung in ursprungsnahen Regionen des Embryos als undifferenzierte NCC (Britsch et al., 1998). Wir konnten darüber hinaus keine Veränderungen von Zellproliferation und Überleben in den Mutanten nachweisen. NRG-1 Signale beeinflussen daher direkt das Migrationsverhalten von sympathogenen NCC. Diese Befunde werden unterstützt durch das Expressionsmuster der beteiligten Komponenten des NRG-1/ErbB Signalsystems: ErbB3 wird in undifferenzierten NCC exprimiert, die zur Bildung des PNS beitragen, während sein Korezeptor ErbB2 in der frühen Embryogenese ubiquitär im Embryo exprimiert ist. Mit Hilfe einer Knockin Mauslinie, die das Reportergen lacZ unter der Kontrolle des NRG-1 Genlocus exprimiert (Meyer and Birchmeier, 1995) konnte ich außerdem zeigen, daß der Ligand NRG-1 dynamisch vom umgebenden Mesenchym entlang des Migrationsweges und im Zielgebiet sympathogener NCC exprimiert wird (Britsch et al., 1998).

Ich habe den Einfluß von NRG-1 Signalen auf das Migrationsverhalten von NCC ebenfalls *in vitro* analysiert. Wird der Ligand NRG-1 in einem sog. Streifenassay in alternierenden Streifen auf einer Zellkulturoberfläche immobilisiert so emigrieren NCC aus Neuralrohrexplantaten bevorzugt und schneller auf NRG-1-beschichteten Streifen (Britsch und Birchmeier, unpublizierte Daten). Übereinstimmende Befunde wurden ebenfalls in einer Arbeit von Mahantappa berichtet (Mahanthappa et al., 1996).

Steuerung von Zellmotilität durch NRG-1 Signale ist nicht nur bei sympathogenen NCC beobachtbar. In genetischen Untersuchungen an Mausembryonen mit einer gezielten Mutation des NRG-1 Gens wurde beobachtet, daß die Zahl von auswandernden Schwanzzellvorläufern - die sich aus undifferenzierten NCC entwickeln (s.o.) - entlang auswachsender Spinalnerven gegenüber Kontrollembryonen verringert ist (Meyer and Birchmeier, 1995). Der gleiche Phänotyp wird außerdem in Mausembryonen mit einer Mutation des erbB2 und erbB3 Gens beobachtet (Britsch et al., 2001; Britsch et al., 1998; Morris et al., 1999; Riethmacher et al., 1997; Woldeyesus et al., 1999). In Explantatkulturen von erbB2 mutantern Gewebe konnte die Gruppe um Kuo-Fen Lee zeigen, daß die Migrationskapazität mutanter Schwanzzellvorläufer gegenüber normalen Zellen verringert ist (Morris et al., 1999).

Embryonen mit Mutationen im erbB2 oder NRG-1 Gen sterben aufgrund einer gestörten Kardiogenese am Tag E10 (s.u.). Um die Entwicklung von NCC und ihren Derivaten während späterer Entwicklungsstadien untersuchen zu können, wurde von Mas Woldeyesus aus der Gruppe von Carmen Birchmeier durch einen *Knockin* die cDNA von erbB2 unter der Kontrolle des Nkx2.5 Gens exprimiert. Nkx2.5 wird spezifisch im embryonalen Herzmuskelgewebe exprimiert. Wird diese Mutation in homozygot mutante erbB2 Tiere eingekreuzt (erbB2^{-/-R}), so wird die durch erbB2 Mutation bedingte, embryonal letale Entwicklungsstörung des Herzens spezifisch kompensiert (Woldeyesus et al., 1999). Diese Tiere überleben bis zur Geburt und können für die Analyse späterer Phänotypen herangezogen werden. In Kooperation mit Mas Woldeyesus haben wir in diesen Tieren die Entwicklung des peripheren Nervensystems untersucht. In den mutanten Tieren ist die einsetzende Differenzierung peripherer Glia aus NCC, sowie die oben beschriebene Migrationsstörung von Schwanzzellvorläufern nachweisbar. Während der weiteren Embryogenese kommt es allerdings zum vollständigen Verlust von Schwanzzellen entlang peripherer Nerven (Britsch et al., 2001; Woldeyesus et al., 1999). Die zellulären Mechanismen, die zu diesem Schwanzzellverlust führen, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. NRG-1 Signale beeinflussen jedoch stadienabhängig nicht nur das Migrationsverhalten sondern auch Proliferation und Überleben von Schwanzzellen während der Embryogenese (Dong et al., 1995; Morris et al., 1999; Woldeyesus et al., 1999; Wolpowitz et al., 2000).

Neben dem Verlust von Schwanzzellen tritt in Mausembryonen mit erbB2R (d.h. gleichzeitigem *Rescue* des Herzphänotyps) oder erbB3 Mutationen zeitlich verzögert eine progrediente Degeneration von sensorischen und motorischen Nerven auf (Britsch et al., 2001; Riethmacher et al., 1997; Woldeyesus et al., 1999). Die betroffenen peripheren Nerven sind u. a. durch ausgeprägte Defaszikulation und Störung ihres Verzweigungsmusters gekennzeichnet. Sie projizieren jedoch in ihre Zielstrukturen und bilden Synapsen aus. Die betroffenen Nerven exprimieren normalerweise keine ErbB2 oder ErbB3 Rezeptoren, es handelt sich also bei der neuronalen Degeneration um keine direkte Folge des

Verlustes von ErbB2/ErbB3 vermittelten, möglicherweise essentiellen (Überlebens-) signalen, sondern um einen indirekten, nicht-zellautonomen Effekt. Dies kann mit Hilfe von Chimärenanalysen belegt werden. In solchen Tieren liegt ein Mosaik aus Geweben mit homozygoter Mutation z. B. des erbB3 Gens und Wildtypgeweben vor. Werden chimäre Tiere erzeugt, mit einem hohen Anteil mutanter Zellen und einem kleinen Anteil Wildtypzellen innerhalb des peripheren Nervensystems, so läßt sich in diesen Tieren keine neuronale Degeneration beobachten (Riethmacher et al., 1997). Dies bedeutet, daß unter dem Einfluß von Signalen einiger Wildtypzellen der mutante Phänotyp normalisiert werden kann, also die neuronale Degeneration indirekte Folge des Verlustes von ErbB2/ErbB3 vermittelten Signalen in nicht-neuronalen Zellen ist. Aufgrund dieser Befunde lag die Hypothese nahe, daß die Neurodegeneration Folge des Verlustes von peripheren Schwanzzellen ist, die sowohl erbB2 als auch erbB3 exprimieren und in den jeweiligen Mausmutanten mutiert sind. Diese Schwanzzellen könnten ihrerseits trophische Signale an die begleitenden Nerven übermitteln. Zwar ist in der Literatur etabliert, daß Schwanzzellen *in vitro* unterschiedliche neurotrophe Faktoren, wie z.B. CNTF, BDNF, GDNF, LIF, PDGF, FGFs, IGF, oder NT3 produzieren (Bunge, 1993; Jessen and Mirsky, 2002), die neuronales Survival beeinflussen, eine derartige Funktion konnte jedoch bisher *in vivo* nicht direkt demonstriert werden. ErbB2 und erbB3 werden außerdem von den neuronalen Targets (innervierter Muskel) der betroffenen Nerven exprimiert. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, daß der Verlust dieser ErbB2/ErbB3 vermittelten Signale in den Mutanten indirekt – z.B. über eine Beeinflussung von sog. *target-derived neurotrophins* – zur beschriebenen Neurodegeneration beiträgt (Bibel and Barde, 2000). Mit Hilfe unabhängiger Experimente in Sox10 mutanten Mäusen konnten wir jedoch die trophische Funktion peripherer Gliazellen für begleitende Nerven belegen. Ich werde auf diese Experimente im Kapitel 2.3.2 ausführlich eingehen.

Die Degeneration von Motoneuronen in erbB2 und erbB3 mutanten Tieren wurde von uns systematisch und quantitativ in unterschiedlichen Höhenlokalisationen des Rückenmarks untersucht. Interessanterweise ist das Ausmaß der Motoneurondegeneration abhängig von ihrem axialen Niveau: Am Tag E18,5 ist ein Großteil zervikaler und lumbaler Motoneurone untergegangen, während sich

keine signifikante Degeneration thorakaler Motoneurone beobachten läßt (Britsch et al., 2001; Woldeyesus et al., 1999). Dies deutet darauf hin, daß sich Motoneuronsubpopulationen in ihrer Abhängigkeit von trophischen Signalen voneinander unterscheiden. Die molekularen Mechanismen, die dieser unterschiedlichen Sensitivität zugrunde liegen, sind bisher nicht aufgeklärt. Es ist jedoch in der Literatur gut etabliert, daß spinale Motoneurone in ihrem Verhalten außerordentlich heterogen sind und sich beispielsweise in ihren Expressionsprofilen von Transkriptionsfaktoren der Lim Familie, oder von Cadherinen unterscheiden (Jessell, 2000; Price et al., 2002). *In vitro* Untersuchungen haben außerdem gezeigt, daß Motoneuronsubpopulationen sich in ihrer Expression des Tyrosinkinaserzeptors c-met und in ihrem Überleben in Gegenwart seines spezifischen Liganden HGF/SF voneinander unterscheiden (Yamamoto et al., 1997).

Es ist bemerkenswert, daß auch beim Menschen neurologische Erkrankungsformen, die mit einer Degeneration von Motoneuronen einhergehen, durch unterschiedliche Befallsmuster und –schwerpunkte gekennzeichnet sein können. Möglicherweise sind daher während der Embryogenese und bei Erkrankungen im adulten Organismus ähnliche molekulare Mechanismen involviert (Suter and Scherer, 2003).

2.2.2 Herzentwicklung

Komponenten des NRG-1/ErbB Signalsystems werden ebenfalls im embryonalen Herzen exprimiert. Während der Embryogenese wird NRG-1 vom Endokard, die spezifischen Rezeptoren ErbB2/ErbB4 vom unmittelbar benachbart angrenzenden Myokardgewebe exprimiert (Gassmann et al., 1995; Lee et al., 1995; Meyer and Birchmeier, 1994; Meyer and Birchmeier, 1995). NRG-1 kann also als parakrines Signal agieren. Im Gegensatz zum PNS wird im embryonalen Herzen kein ErbB3 exprimiert. Die Funktion von NRG-1 Signalen während der Kardiogenese konnte durch die Analyse von Mäusen mit gezielter Mutation einzelner Elemente des NRG-1/ErbB Signalsystems aufgeklärt werden. Homozygot mutante NRG-1, erbB2 und erbB4 Mäuse zeigen übereinstimmende Entwicklungsdefekte des

Herzens, die durch das Fehlen der normalen Trabekulierung, die Ausdünnung der embryonalen Herzwände und eine starke Erweiterung der primitiven Ventrikel gekennzeichnet sind (Britsch et al., 1998; Erickson et al., 1997; Gassmann et al., 1995; Kramer et al., 1996; Lee et al., 1995; Liu et al., 1998; Meyer and Birchmeier, 1995). Diese kardialen Entwicklungsdefekte sind embryonal letal: Homozygot mutante NRG-1, erbB2 und erbB4 Mäuse sterben in einem Zeitfenster um den Entwicklungstag E10,5. Die essentielle Funktion von NRG-1/ErbB Signalen für die Embryogenese des Herzens konnte in eleganten, genetischen Experimenten aus den Arbeitsgruppen von Carmen Birchmeier und von K.F. Lee erhärtet werden: Wird in Mäusen mit homozygoter Mutation des erbB2 Gens erbB2 cDNA als Transgen spezifisch im Herz reexprimiert (erbB2-/-R), so besitzen diese Tiere eine normale Kardiogenese und überleben über den 10. Entwicklungstag hinaus (Morris et al., 1999; Woldeyesus et al., 1999). Allerdings sterben alle erbB2-/-R Tiere bis zur Geburt. Die zeitliche Dynamik der embryonalen Letalität entspricht dabei jener von erbB3-/- Tieren (Britsch et al., 1998; Riethmacher et al., 1997; Woldeyesus et al., 1999). Untersucht man das PNS in erbB2-/-R Embryonen, so finden sich wiederum die gleichen Entwicklungsdefekte wie in erbB3-/- Tieren, Verlust von Schwann Zellen, Degeneration von sensorischen und Motoneuronen und subtotale Hypoplasie des SNS (vergl. Kapitel 2.2.1). Diese Beobachtungen belegen damit - jenseits der Analyse herzspezifischer Funktionen von NRG-1/ErbB Signalen - genetisch, daß ErbB2 als essentieller Korezeptor von erbB4 im Herzen *und* von ErbB3 im PNS fungiert (Morris et al., 1999; Woldeyesus et al., 1999).

Zelluläre und molekulare Mechanismen der Trabekulierung des Myokards sind bisher nicht exakt bekannt. Ebenso ist unklar, über welche Mechanismen NRG-1/ErbB2/4 Signale die Trabekulierung steuern. Genetische und *in vitro* Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, daß NRG-1 Signale Proliferation und Überleben von Kardiomyozyten und/oder die Koppelung von Erregung und Kontraktion im Myokard zu beeinflussen vermögen. So führt z.B. die Mutation des spannungsabhängigen Na-Kanals SCN5a in Mäusen, der eine wichtige Rolle bei der elektromechanischen Koppelung spielt, ebenfalls zu einer gestörten Trabekulierung des Myokards (Garratt et al., 2003; Papadatos et al., 2002).

Interessanterweise sind NRG-1 Signale auch für die funktionelle Integrität des adulten Herzens bedeutsam. So werden ErbB2 und ErbB4 im T-Tubulus System und NRG-1 im Endokard auch des adulten Herzens exprimiert (Ozcelik et al., 2002). Die konditionelle Mutation des erbB2 Gens im Herzen mit Hilfe des Cre-loxP Systems (Lewandoski, 2001) hat gezeigt, daß homozygot mutante Mäuse postnatal das klinische und histopathologische Bild einer dilatativen Kardiomyopathie entwickeln, wobei der exakte molekulare Mechanismus über den ErbB2 die Physiologie des adulten Myokards beeinflusst, bisher unklar ist (Ozcelik et al., 2002).

2.3 Funktionen des Transkriptionsfaktors Sox10 in der Entwicklung des peripheren Nervensystems

Bisher liegen nur sehr wenige Daten über Moleküle vor, die genetisch mit Komponenten des NRG-1/ErbB Signalsystems interagieren (Buonanno and Fischbach, 2001; Citri et al., 2003; Falls, 2003; Yarden and Sliwkowski, 2001). In meinen eigenen Untersuchungen konnte ich mit dem Transkriptionsfaktor Sox10 ein Molekül identifizieren, das genetisch mit erbB3 interagiert und dessen Expression in NCC kontrolliert (Britsch et al., 2001). Sox10 wurde erstmals in einem PCR-Screen für neue SRY-like HMG-Box Gene von der Arbeitsgruppe um Michael Wegner beschrieben (Kuhlbrodt et al., 1998a). Sox10 ist durch seine hochkonservierte SRY-Box-DNA-Bindungsdomäne und seine Transaktivierungsdomäne charakterisiert (Abb.:2.3-1). Gegenwärtig sind in Säugern mehr als 20 Mitglieder innerhalb der Sox Genfamilie bekannt, die in unterschiedlichen Gruppen gegliedert werden und je nach Mitglied transkriptionelle Repressoren oder Aktivatoren darstellen. Sox10 ist ein transkriptioneller Aktivator der Gruppe E (Kamachi et al., 2000; Wegner, 1999). Transkriptionsfaktoren der Sox Familie üben vielfältige kritische Funktionen während der Embryogenese aus, so z. B. bei der Chondrogenese (Sox6, 9), der Geschlechtsdeterminierung (Sox9), der Neurogenese (Sox2, 3), oder der Lymphopoese (Sox4) (Pevny and Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). Charakteristischerweise sind Sox Proteine multifunktional, d.h. sie können

sequentiell unterschiedliche entwicklungsbiologische Funktionen ausüben (Akiyama et al., 2002; Wilson and Koopman, 2002).

Sox10 wird von undifferenzierten NCC unmittelbar nach ihrer Bildung exprimiert. Seine Expression wird in NCC, die sich zu peripheren Gliazellen oder Melanozyten differenzieren aufrechterhalten (Britsch et al., 2001; Herbarth et al., 1998; Kuhlbrodt et al., 1998a; Pusch et al., 1998).

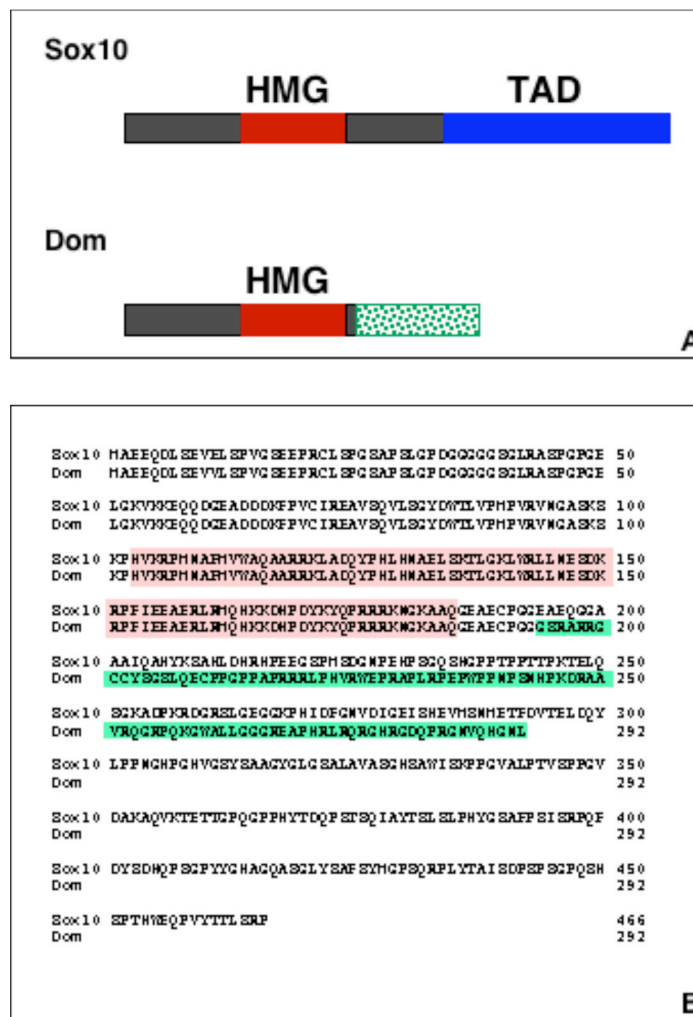


Abbildung 2.3-1: A, schematische Darstellung des Wildtyp Sox10 Proteins mit HMG-Box DNA-Bindungsdomäne (rot) und Transaktivierungsdomäne (TAD, blau) und des vom Dom Allel synthetisierten trunkierten Proteins. **B**, korrespondierende Aminosäuresequenzen beider Proteine. Die HMG-Box kodierenden Sequenzen wurden hellrot unterlegt. Beachte den Frameshift an Position 194 und das resultierende veränderte Leseraster mit vorzeitiger Termination an Position 292 (grün unterlegt) beim Dom Allel.

1984 wurde in den *Jackson Laboratories* erstmals das Auftreten einer Spontanmutation in Mäusen beobachtet, die in heterozygotem Zustand durch

einen weißen Bauchfleck und ein wechselnd stark ausgeprägtes Megakolon charakterisiert ist. Diese neue Mutation wurde daher Dom (für dominantes Megakolon) bezeichnet (Lane and Liu, 1984). Postnatal wurden keine Mäuse mit homozygoter Mutation beobachtet, woraus geschlossen werden konnte, daß das Dom Allel in homozygotem Zustand letal sein muß.

Die Arbeitsgruppen von Bill Pavan am NIH und von Michael Wegner, Universität Erlangen, konnten 1998 unabhängig voneinander zeigen, daß dem Dom Allel in Mäusen eine Frameshift-Mutation im *sox10* Gen zugrundeliegt (Herbarth et al., 1998; Southard-Smith et al., 1998). Als Folge dieser Mutation werden zwar stabile Transkripte gebildet, sie kodieren jedoch für ein funktionsloses, trunkiertes Protein mit deletierter Transaktivierungsdomäne (Abb.: 2.3-1).

2.3.1 ErbB3-abhängige entwicklungsbiologische Funktionen von Sox10

Vergleicht man systematisch die Expression von *erbB3* und *sox10* während der Embryonalentwicklung von Mäusen, so wird deutlich, daß beide Gene in nahezu identischem Muster in sich entwickelnden NCC exprimiert sind. Beide Gene werden in NCC erstmals unmittelbar nach ihrer Bildung durch das dorsale Neuralrohr exprimiert. Expression ist außerdem in allen primären NCC-Derivaten des PNS nachweisbar: *Sox10* und *erbB3* sind am Tag E10,5 koexprimiert in den Anlagen der Spinalganglien, der Anlage des SNS, in vagalen NCC, die in das primitive Darmrohr einwandern und die Anlage des ENS bilden, in den Anlagen kranialer Ganglien, wie z. B. dem Trigeminalganglion, sowie in Schwanzzellvorläufern entlang auswachsender Spinalnerven (Britsch et al., 2001). Beide Gene besitzen darüber hinaus nicht-überlappende, eigenständige Expressionsdomänen, so ist *erbB3*, nicht aber *sox10* am Tag E10,5 im Myotom, *sox10* jedoch nicht *erbB3* in Melanozytenvorläufern exprimiert. Aufgrund dieser Befunde haben wir die Hypothese formuliert, daß beide Gene genetisch miteinander interagieren. Um dies *in vivo* zu analysieren, haben wir die Expression beider Gene in Mäusen mit homozygoter Mutation des *erbB3* Gens (Riethmacher et al., 1997) und mit homozygotem Dom Allel (s. o.) bestimmt. Die Expression von

sox10 ist in homozygot mutanten erbB3 Mäusen unverändert in NCC nachweisbar. Demgegenüber ist am Tag E10,5 in homozygot sox10 mutanten Mäusen keine erbB3 Expression in NCC nachweisbar. In früheren Entwicklungsstadien konnten wir darüber hinaus beobachten, daß erbB3 in neu gebildeten NCC exprimiert wird. Die Expression wird jedoch abgeschaltet, unmittelbar nachdem diese Zellen begonnen haben von ihrem Ursprungsort, dem dorsalen Neuralrohr, zu emigrieren. ErbB3 Expression kann daher zwar unabhängig von Sox10 in NCC initiiert werden, die Aufrechterhaltung der Expression ist jedoch abhängig von Sox10 (Britsch et al., 2001). Unsere *in vivo* Beobachtungen konnten in Kooperation mit der Gruppe von Michael Wegner *in vitro* bestätigt werden: Transfektion mit Sox10-Wildtyp cDNA nicht aber mit Sox10^{Dom} oder Sox11 cDNA führt zur Hochregulation der endogenen erbB3 Expression in N2A Zellen (Britsch et al., 2001). Gegenwärtig ist unklar, ob Sox10 und erbB3 direkt oder indirekt miteinander interagieren. Die sehr rasche Induktion *in vitro* legt eine direkte Interaktion nahe. In Reporter Assays konnte allerdings bisher innerhalb des genomischen Locus von erbB3 kein sox10 responsives Element nachgewiesen werden (Wegner, Peirano und Riethmacher, unpublizierte Daten; vergl. Britsch et al., 2001). Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen können Promotor- und Enhancerelemente von Genen außerordentlich weit vom eigentlichen Genlocus entfernt liegen. Sie sind in solchen Fällen in einfachen Reporter Assays nur sehr schwer nachweisbar. Zum anderen wurde mehrfach gezeigt, daß Interaktionen von Sox10 mit Zielgenen komplexen Determinanten unterliegt. So variieren die Sequenzen identifizierter DNA-Bindungsregionen von Sox10 untereinander erheblich. Dies deutet darauf hin, daß flankierende Regionen, Protein-Protein Interaktionen, oder die Kooperation mit anderen DNA-Bindungspartnern die Bindungsspezifität und –stabilität beeinflussen (Kamachi et al., 2000; Mollaaghababa and Pavan, 2003). Im Falle der Bindung von Sox10 an sein direktes Target-Gen P₀, das für ein Myelin-assoziiertes Glykoprotein kodiert, wurde nachgewiesen, daß flankierende DNA-Sequenzen und die Bindung von Sox10 als Dimer wichtig sind für die Spezifität der Target-Gen Interaktion (Peirano et al., 2000; Peirano and Wegner, 2000). Interessanterweise wird auch die Entwicklung des ENS von Sox10 durch komplexe Interaktion mit dem Target-Gen c-ret gesteuert. Der Tryrosinkinase-rezeptor c-ret vermittelt essentielle

Überlebenssignale an NCC, die das primitive Darmrohr besiedeln und sich zu enterischen Nervenzellen differenzieren. Sowohl Mäuse mit homozygoter *c-ret* als auch *sox10* Mutation entwickeln ein Megakolon als Folge untergegangener enterischer Nervenzellen (Durbec et al., 1996; Herbarth et al., 1998; Kapur, 1999; Schuchardt et al., 1994; Southard-Smith et al., 1998). *Sox10* kontrolliert die Expression von *c-ret* allerdings nicht alleine sondern muß direkt mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, *Pax3*, interagieren, der in unmittelbarer Nachbarschaft von *sox10* an ein *c-ret* Enhancerelement bindet (Lang et al., 2000; Lang and Epstein, 2003).

Da *Sox10* die Expression von *erbB3* in NCC kontrolliert, haben wir erwartet, in beiden, homozygot *sox10* und *erbB3* mutanten Tieren ähnliche, bzw. identische Phänotypen zu beobachten. In der Tat finden wir in beiden Mutanten identische Defekte in der Entwicklung von kranialen Ganglien (Britsch et al., 2001; Britsch et al., 1998; Erickson et al., 1997; Riethmacher et al., 1997), beide Mutanten weisen eine hochgradige Hypoplasie der Anlage des SNS auf, und in beiden ist die Zahl von Schwanzzellvorläufern entlang auswachsender Spinalnerven reduziert (Britsch et al., 2001). Der Schweregrad der Störungen in der Migration von NCC ist dabei bemerkenswerterweise in *sox10* Mutanten etwas geringer als in *erbB3* Mutanten. Dies wird verständlich, aufgrund der passageren Expression von *erbB3* in *sox10* Mutanten. Betrachtet man also lediglich diese *erbB3*-abhängige entwicklungsbiologische Funktion, so stellt die homozygote Mutation des *sox10* Gens in der Maus in gewisser Weise eine hypomorphe Rekapitulation des Phänotyps *erbB3* mutanter Mäuse dar (Britsch et al., 2001).

Neben den beschriebenen, *ErbB3*-abhängigen entwicklungsbiologischen Funktionen besitzt *Sox10* weitere, *ErbB3*-unabhängige entwicklungsbiologische Funktionen. So ist *Sox10* unabhängig von *ErbB3* essentiell für die normale Entwicklung des ENS (s.o.) und die Entwicklung von Melanozyten (Britsch et al., 2001; Mollaaghababa and Pavan, 2003; Wegner, 1999). In unseren eigenen Untersuchungen konnten wir eine neue, *ErbB3*-unabhängige entwicklungsbiologische Funktion von *Sox10* identifizieren: *Sox10* besitzt eine Schlüsselfunktion bei der Etablierung der peripheren Gliazell *Lineage*.

2.3.2 Sox10 als Schlüsselmolekül in der Entwicklung peripherer Gliazellen

Im Kapitel 2.2.1 wurde dargestellt, daß NRG-1/ErbB2/3 Signale essentiell sind für die Schwanzzellentwicklung: Anhand der Expression von charakteristischen Markergenen wie B-FABP (Kurtz et al., 1994) oder Notch-1 (Jessen and Mirsky, 2002; Morris et al., 1999; Weinmaster et al., 1991) sind differenzierende Schwanzzellen entlang von Spinalnerven und differenzierende Satellitenzellen im Bereich von Spinalganglien am Tag E11,5 der Embryogenese in NRG-1 Signalmutanten nachweisbar. Periphere Gliazelldifferenzierung *per se* findet also in diesen Mutanten statt. NRG-1 Signale sind jedoch essentiell für die Migration, das Überleben und die Proliferation von Schwanzzellen und ihren Vorläufern. Als Folge kommt es in den Mutanten zum progredienten Verlust von Schwanzzellen im gesamten PNS (Britsch et al., 2001; Meyer and Birchmeier, 1995; Riethmacher et al., 1997; Woldeyesus et al., 1999; Wolpowitz et al., 2000). Sox10 kontrolliert die Expression von erbB3 auch in jenen NCC Populationen, aus denen sich periphere Gliazellen differenzieren. Wir haben daher zunächst erwartet, in sox10 Mutanten ebenfalls eine Rekapitulation des peripheren Glia Phänotyps von NRG-1 Signalmutanten zu beobachten. Überraschenderweise läßt sich jedoch in sox10 Mutanten keinerlei Differenzierung von peripherer Glia aus undifferenzierten NCC beobachten (Britsch et al., 2001). Sox10 exprimierende NCC sind jedoch im Bereich von Spinalganglien, einem Ort der Gliadifferenzierung, nachweisbar. In Koexpressionsanalysen konnten wir demonstrieren, daß diese sox10 exprimierenden NCC in homozygoten sox10 Mutanten keine alternativen Zellschicksale annehmen und als undifferenzierte, stammzellartige NCC verharren. Während der weiteren Entwicklung werden sie durch Apoptose eliminiert. Unsere Befunde werden bestätigt durch *in vitro* Untersuchungen an NCC, die aus homozygot mutanten Sox10 Embryonen etabliert wurden: In Zellkultur ist Sox10 ebenfalls essentiell für die Gliadifferenzierung aus undifferenzierten NCC (Paratore et al., 2001).

Die molekularen Mechanismen, welche die Etablierung und Differenzierung der peripheren Gliazell *Lineage* aus undifferenzierten NCC steuern, waren bisher nur anfänglich verstanden. In unseren Untersuchungen konnten wir mit Sox10

erstmalig *in vivo* ein Schlüsselmolekül in der Steuerung dieser Prozesse identifizieren. In *sox10* Mutanten läßt sich in NCC im Bereich von Spinalganglien keine Expression von Notch-1 oder des intrazellulären Effektors von Notch-1 Signalen, Hes-5, nachweisen (Britsch et al., 2001). In der Literatur ist vielfach etabliert, daß Delta/Notch Signale die Determinierung alternativer Zellschicksale im sich entwickelnden Nervensystem steuern (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Baker, 2000; Wang and Barres, 2000). Interessanterweise konnte *in vitro* gezeigt werden, daß die transiente Aktivierung des Delta/Notch Signalweges in undifferenzierten NCC zu irreversibler glialer Differenzierung zu Ungunsten neuronaler Differenzierung führt (Morrison et al., 2000; Wakamatsu et al., 2000). Es dürfte daher interessant sein, in zukünftigen Untersuchungen zu analysieren, ob Sox10 durch Interaktion mit Komponenten des Delta/Notch Signalweges periphere Gliogenese steuert. Aktuelle Untersuchungen, bei denen Sox10 *in vitro* überexprimiert wurde deuten darauf hin, daß Sox10 mehrere, unabhängige Funktionen während der Entwicklung von NCC ausübt. So scheint Sox10 (i) *in vitro* ebenfalls die Kapazität undifferenzierter NCC zu glialer *und* neuronaler Differenzierung in Gegenwart induzierender Faktoren aufrechtzuerhalten und (ii) den TGF- β induzierten Proliferationsstop von NCC zu hemmen, damit also den Stammzellcharakter von NCC zu erhalten (Kim et al., 2003).

Auf weitere, unabhängige Funktionen von Sox10 während der späten Differenzierung von Schwannzellen deuten Untersuchungen hin, wonach Myelinogenese-assoziierte Gene wie P_0 , oder Differenzierungsgene wie Connexin 32 direkte Targets von Sox10 sind (Bondurand et al., 2001; Peirano et al., 2000). Interessanterweise werden auch beim Menschen Sox10 Mutationen beobachtet, die mit Myelinisierungsstörungen und peripheren Neuropathien einhergehen, welche Ähnlichkeit mit einem Charcot-Marie-Tooth Syndrom Typ I aufweisen, einem Krankheitssyndrom das typischerweise mit Schwannzelldefekten einhergeht (Bondurand et al., 1999; Inoue et al., 1999; Kuhlbrodt et al., 1998b; Pingault et al., 1998; Pingault et al., 2001; Pingault et al., 2000; Touraine et al., 2000).

Wenngleich Sox10 und ErbB2/3 über unterschiedliche molekulare Mechanismen die Entwicklung von Schwannzellen steuern, führt die Mutation beider Gene zu

identischen entwicklungsbiologischen Konsequenzen, nämlich dem vollständigen Verlust von Schwanzzellen in der späteren Embryogenese. Es war daher von großem Interesse, *sox10* Mutanten auf das Vorliegen einer peripheren Neuropathie, wie wir sie in *erbB2/erbB3* Mutanten beobachtet haben zu analysieren (vergl. Kapitel 2.2.1). Der Vergleich beider, *erbB3* und *sox10*, Mutanten hat gezeigt, daß in beiden Tieren eine motorische Neuropathie auftritt mit identischem zeitlichem Verlauf und identischer axialer Verteilung betroffener Neuronenpopulationen (Britsch et al., 2001). *Sox10* wird im Gegensatz zu Komponenten des NRG-1 Signalsystems innerhalb dieses biologischen Systems ausschließlich in Gliazellen exprimiert. Unsere Beobachtungen konnten damit nachweisen, daß die Degeneration von Motoneuronen direkte Folge eines Verlustes von Schwanzzellen und damit möglicherweise von Schwanzzell-abkünftigen Signalen ist. Eine der interessantesten Aufgaben auf diesem Feld wird zukünftig sein, diese Signale molekular zu identifizieren.

Schwanzzellentwicklung verläuft in Mausmutanten mit spezifischer Deletion der Type I und II Isoformen von NRG-1 (Kramer et al., 1996) im Gegensatz zu Mäusen mit einer Nullmutation aller NRG-1 Isoformen (Meyer and Birchmeier, 1995), oder Mäusen mit spezifischer Mutation der Type III Isoform (Wolpowitz et al., 2000) normal. Type III NRG-1 scheint daher funktionell entscheidend für die Übertragung von NRG-1 Signalen in Schwanzzellen zu sein (Meyer et al., 1997). Type III NRG-1 wird als transmembranärer Ligand an der Axonoberfläche sensorischer und motorischer Neurone des PNS exprimiert (Birmingham-McDonogh et al., 1997; Yang et al., 1998). Interessanterweise wurde *In vitro* beobachtet, daß diese Isoform als bi-direktionales Signalmolekül agieren kann: So kann Type III NRG-1 als klassischer ErbB2/ErB3 Rezeptor Ligand Signale auf eine Zielzelle übertragen (*forward signalling*). Rezeptor-Liganden Interaktion kann jedoch außerdem zur proteolytischen Abspaltung des zytoplasmatischen Teils von Type III NRG-1 und dessen Translokation in den Nukleus führen (*back signalling*), wo er die Expression pro-apoptotischer Gene reprimiert (Bao et al., 2003). Diese Befunde deuten auf ein Modell hin, bei dem (i) axonale Type III NRG-1 Signale Entwicklung und Survival von begleitenden Schwanzzellen steuern, die ErbB2/ErB3 exprimieren und (ii) Rezeptor-Liganden Interaktion gleichzeitig ein kritisches Survival Signal in Neuronen induziert, das retrograd über den Liganden

(Type III NRG-1) vermittelt wird (Bao et al., 2003). NRG-1/ErbB2/ErbB3 Signale wären daher kritisch, sowohl für Entwicklung und Überleben von Schwannzellen, als auch für das Überleben begleitender Nerven.

2.4 Neuregulin-1/ErbB Signalmutanten als genetische Werkzeuge

Mäuse mit Nullmutationen bestimmter Gene (*knockout* Mäuse oder natürliche Mausmutationen) können nicht nur zur Analyse spezifischer Funktionen des inaktivierten Gens eingesetzt werden, sie können darüber hinaus als genetische Werkzeuge zur Untersuchung unabhängiger, oder assoziierter biologischer Prozesse verwendet werden. Im Vorausgegangen wurde dies am Beispiel der Entwicklung peripherer Gliazellen dargestellt: NRG-1/ErbB2/3 Signale und der Transkriptionsfaktor Sox10 steuern unterschiedliche Ereignisse in der Entwicklung peripherer Glia und sind beide essentiell für die Bildung von Schwannzellen während der Embryogenese. Beide Mutationen gehen mit dem Verlust von Schwannzellen im Laufe der Embryonalentwicklung einher und können daher als Modelle, oder Werkzeuge eingesetzt werden, um Embryogenese in Abwesenheit von peripherer Glia zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Modelle konnten wir erstmals *in vivo* demonstrieren, daß Schwannzellen bzw. von diesen generierte Signale essentiell sind für das Überleben begleitender Neurone (Britsch et al., 2001; Woldeyesus et al., 1999).

In einer Kooperation mit dem Labor von David Anderson (Caltech, Pasadena) wurde das Fehlen von Schwannzellen in *erbB3*^{-/-} Mäusen außerdem ausgenutzt, um den Einfluß peripherer Nerven auf Entwicklung und Musterbildung begleitender Blutgefäße zu untersuchen (Mukoyama et al., 2002). Sensorische Nerven und Blutgefäße der Haut bilden im Laufe der Embryogenese jeweils komplexe Verzweigungsmuster aus. Bisher war unklar ob die Musterbildung in beiden Systemen durch intrinsische, voneinander unabhängige Faktoren, durch wechselseitige Interaktionen, oder durch übergeordnete Umgebungssignale gesteuert wird (Shima and Mailhos, 2000). Arterielle Gefäße, nicht jedoch venöse

Gefäße folgen in ihrem eigenen Verzweigungsmuster mit beginnender Expression arterieller Differenzierungsmarker (ephrinB2, NP1, Connexin 40) bevorzugt dem Verzweigungsmuster peripherer sensorischer Nerven. In Mäusen mit gleichzeitiger homozygoter Mutation der bHLH Transkriptionsfaktoren Neurogenin1 und Neurogenin2 kommt es zum fast vollständigen Verlust von Spinalganglien und peripheren sensorischen Nerven (Ma et al., 1999). In solchen Mäusen, d.h. in Abwesenheit peripherer sensorischer Nerven ist die arterielle Differenzierung und Gefäßmusterbildung gestört und es findet kein Rearrangement des primitiven embryonalen Gefäßmusters statt. In Mäusen mit homozygoter Mutation des axonalen Wegfindungsmoleküls Semaphorin3A (Kolodkin, 1998) ist das Projektionssmuster peripherer sensorischer Nerven gestört (Taniguchi et al., 1997). Interessanterweise folgen in diesen Mäusen differenzierende arterielle Blutgefäße dem gestörten Verzweigungsmuster sensorischer Nerven – hieraus konnte geschlossen werden, daß arterielle Gefäßmusterbildung unter dem Einfluß von Signalen begleitender Nerven erfolgt. Wird schließlich Gefäßmusterbildung in erbB3-/- Mäusen, d.h. in Anwesenheit peripherer sensorischer Nerven aber in Abwesenheit von Schwann Zellen (Britsch et al., 2001; Riethmacher et al., 1997; Woldeyesus et al., 1999) untersucht, so zeigen diese ebenfalls eine gestörte arterielle Differenzierung und Gefäßmusterbildung, woraus geschlossen werden kann, daß Schwann Zellen essentiell sind für die Induktion ortstypischer Musterbildung und arterieller Differenzierung von Blutgefäßen durch begleitende sensorische Nerven (Mukouyama et al., 2002).

3. Zusammenfassung

Neuregulin-1 stellt ein EGF-ähnliches, extrazelluläres Signalmolekül dar, das mit transmembranären Tyrosinkinaserzeptoren der EGF-Rezeptorfamilie, ErbB2, ErbB3 und ErbB4, interagiert. Funktionelle Neuregulin-1 Rezeptoren sind *in vivo* ErbB2/ErbB3 bzw. ErbB2/ErbB4 Heteromere. Das Neuregulin-1/ErbB Signalsystem steuert embryonal und im adulten Organismus vielfältige biologische Prozesse, wie z. B. Proliferation, Überleben, Migration und Differenzierung von Zellen und Geweben (Garratt et al., 2000).

In den vorgelegten Arbeiten wurden spezifische entwicklungsbiologische Funktionen des Neuregulin-1/ErbB Signalsystems mit Hilfe von *Gene Targeting* und anhand natürlicher Mutationen in der Maus untersucht. Während der Embryogenese der Maus werden ErbB3 Rezeptoren spezifisch von Neuralleistenzellen und ihren Gliaderivaten, ErbB4 Rezeptoren von Herzmuskelzellen und im ZNS exprimiert. Demgegenüber ist der Korezeptor ErbB2 ubiquitär im Embryo exprimiert. Durch Analyse und Vergleich von Mäusen mit gezielten Mutationen des Neuregulin-1, erbB2 und erbB3 Gens (*knockout* Mäuse) konnte ich zeigen, daß Neuregulin-1/ErbB2/ErbB3 Signale essentiell sind für die Normogenese des sympathischen Nervensystems. In homozygot mutanten Mäusen entwickelt sich eine subtotale Hypoplasie der primären Anlage des sympathischen Nervensystems im Bereich des Rumpfes sowie eine vollständige Agenesie des Nebennierenmarks. Als Folge kommt es zur hochgradigen Einschränkung der Katecholaminsynthese und zur Beeinträchtigung der embryonalen Lebensfähigkeit der betroffenen Mäuse. Der zelluläre Mechanismus über den Neuregulin-1 Signale die frühe Entwicklung des sympathischen Nervensystems steuern, wurde aufgeklärt: In den mutanten Mäusen sind sympathogene Neuralleistenzellen nicht in der Lage, in ihre Zielstrukturen einzuwandern, wo sie sich normalerweise zu sympathischen Neuronen und Gliazellen differenzieren. Stattdessen verharren sie als undifferenzierte Neuralleistenzellen in unmittelbarer Nähe ihres Ursprungs, dem dorsalen Neuralrohr. Neuregulin-1 Signale besitzen dagegen keinen Einfluß auf

Proliferation oder Überleben undifferenzierter, sympathogener Neuralleistenzellen. Hieraus konnte abgeleitet werden, daß Neuregulin-1/ErbB2/ErbB3 Signale direkt das Migrationsverhalten undifferenzierter, sympathogener Neuralleistenzellen steuern (Britsch et al., 1998).

Neuregulin-1/ErbB2/ErbB3 Signale sind außerdem kritisch für die Entwicklung peripherer Gliazellen, die sich ebenfalls aus Neuralleistenzellen differenzieren. In homozygot mutanten *erbB2* und *erbB3* Tieren findet Gliadifferenzierung *per se* statt, die Emigration von Gliavorläuferzellen entlang auswachsender Spinalnerven, sowie ihre Proliferation und Überleben sind jedoch gestört. In Zusammenarbeit mit Dr. M. Woldeyesus aus der Gruppe von Frau Prof. Carmen Birchmeier konnte gezeigt werden, daß dies in der späten Embryogenese zum vollständigen Verlust von Schwann Zellen, sowie sekundär (s.u.) zur Ausbildung einer degenerativen peripheren Neuropathie in den betroffenen Nerven führt (Britsch et al., 2001; Woldeyesus et al., 1999).

Das Neuregulin-1/ErbB Signalsystem ist ebenfalls kritisch für die embryonale Kardiogenese und die funktionelle Integrität des adulten Herzens (Britsch et al., 1998; Ozelik et al., 2002; Woldeyesus et al., 1999). So bildet sich embryonal in Neuregulin-1 und *erbB2* Mutanten keine normale Trabekulierung des Herzmuskels aus. Als Folge kommt es zur Dilatation und zum Pumpversagen der embryonalen Herzen.

Durch den systematischen Phänotypenvergleich von Mäusen mit homozygoten Mutationen des *ErbB2*, *ErbB3* und des Neuregulin-1 Gens konnte genetisch *in vivo* gezeigt werden, daß das Neuregulin-1/ErbB Signalsystem während der Embryogenese stadienabhängig komplexe, voneinander unabhängige Entwicklungsprozesse steuert, die in Neuralleistenzellen durch ErbB2/ErbB3 Heteromere und im Herz durch ErbB2/ErbB4 Heteromere übertragen werden.

In weitergehenden Untersuchungen konnte ich außerdem zeigen, daß der HMG-Box Transkriptionsfaktor Sox10 genetisch mit dem Neuregulin-1 Rezeptor ErbB3 interagiert und *in vivo* dessen Expression in Neuralleistenzellen kontrolliert. Sox10

und erbB3 sind in Neuralleistenzellen und ihren Derivaten koexprimiert. Mäuse mit Mutationen im Sox10 und ErbB3 Gen besitzen daher überlappende Phänotypen. Darüber hinaus konnte eine weitere zentrale Funktion von Sox10 während der Embryogenese aufgeklärt werden: Sox10 ist – unabhängig von ErbB3-vermittelten Signalen – ein Schlüsselmolekül bei der Entwicklung von Gliazellen des peripheren Nervensystems und kontrolliert die Differenzierung der gesamten Gliazell *lineage* aus undifferenzierten Neuralleistenzellen (Britsch et al., 2001).

ErbB2/ErbB3 vermittelte Signale und Sox10 kontrollieren damit über unterschiedliche, voneinander unabhängige Mechanismen die Entwicklung peripherer Glia, beide Mutationen führen jedoch zu identischen entwicklungsgeschichtlichen Konsequenzen, dem kompletten Verlust von Schwann Zellen. Im Gegensatz zu Komponenten des Neuregulin-1/ErbB Signalsystems ist Sox10 ausschließlich in peripherer Glia exprimiert. In beiden Mutationen entwickelt sich in Abwesenheit von Schwann Zellen eine progrediente Degeneration von Motoneuronen, die in ihrer räumlich-zeitlichen Ausprägung nicht unterscheidbar voneinander sind. Mit dieser Beobachtung konnte erstmals *in vivo* eine direkte trophische Funktion von Schwann Zellen für begleitende periphere Nerven demonstriert werden (Britsch et al., 2001). – Durch welche Signale Schwann Zellen diese Funktion ausüben, ist bisher unklar. Es dürfte eine der interessantesten zukünftigen Fragestellungen auf diesem Feld sein, diese Faktoren molekular zu identifizieren.

4. Abkürzungsverzeichnis

-/-	homozygote Nullmutation eines betreffenden Gens
ARIA	<u>a</u> cetylcholine <u>r</u> eceptor <u>i</u> nducing <u>a</u> ctivity
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bHLH	basic helix-loop-helix
BMP	bone morphogenetic protein
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CRD	cystein-rich domain
Dom	dominant megacolon
E	Entwicklungstag
EGF	epidermal growth factor
ENS	Enterisches Nervensystem
ErbB	abgeleitet von avian <u>e</u> rythro <u>b</u> lastosis tumour virus, der für eine onkogene Variante des EGF-Rezeptors (=ErbB1) kodiert, heute Familienname der Rezeptortyrosinkinasen ErbB1-ErbB4
ErbB2-/-R	homozygote Nullmutation des erbB2 Gens mit transgener <u>R</u> eexpression von erbB2 im Herz
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FGF	fibroblast growth factor
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GGF	glial growth factor
IF	impact factor
IGF	insulin-like growth factor-1
LIF	leukemia inhibitory factor
NCC	Neuralleistenzelle(n)
NDF	neu differentiation factor
NRG	Neuregulin
NT	neurotrophin (1-4)
PDGF	platelet-derived growth factor
PNS	Peripheres Nervensystem
PSNS	Parasympathisches Nervensystem
RTK	Rezeptortyrosinkinase(n)
Shh	Sonic Hedgehog
SMDF	sensory and motoneuron derived factor
SNS	Sympathisches Nervensystem
Sox	Sry box
TGF- β	transforming growth factor β
VEGF	vascular endothelial cell growth factor

5. Literaturverzeichnis

- Adlkofer, K. and Lai, C.** (2000). Role of neuregulins in glial cell development. *Glia* **29**, 104-11.
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. and de Crombrughe, B.** (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* **16**, 2813-28.
- Anderson, D. J., Groves, A., Lo, L., Ma, Q., Rao, M., Shah, N. M. and Sommer, L.** (1997). Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**, 493-504.
- Anderson, K. V. and Ingham, P. W.** (2003). The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nat Genet* **33 Suppl**, 285-93.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Baker, N. E.** (2000). Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *Bioessays* **22**, 264-73.
- Bao, J., Wolpowitz, D., Role, L. W. and Talmage, D. A.** (2003). Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* **161**, 1133-41.
- Birmingham-McDonogh, O., Xu, Y. T., Marchionni, M. A. and Scherer, S. S.** (1997). Neuregulin expression in PNS neurons: isoforms and regulation by target interactions. *Mol Cell Neurosci* **10**, 184-95.
- Bibel, M. and Barde, Y. A.** (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* **14**, 2919-37.
- Bondurand, N., Girard, M., Pingault, V., Lemort, N., Dubourg, O. and Goossens, M.** (2001). Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet* **10**, 2783-95.
- Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Pingault, V., Enderich, J., Sajus, M., Tommerup, N., Warburg, M., Hennekam, R. C., Read, A. P., Wegner, M. et al.** (1999). A molecular analysis of the yemenite deaf-blind hypopigmentation syndrome: SOX10 dysfunction causes different neurocristopathies. *Hum Mol Genet* **8**, 1785-9.
- Britsch, S., Goerich, D. E., Riethmacher, D., Peirano, R. I., Rossner, M., Nave, K. A., Birchmeier, C. and Wegner, M.** (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* **15**, 66-78.
- Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C. and Riethmacher, D.** (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* **12**, 1825-36.
- Britsch, S., Strehle, M. and Birchmeier, C.** (2003). Tiermodelle in der Biomedizinischen Forschung. In *Handbuch der Molekularen Medizin, Bd. 1, Molekular und Zellbiologische Grundlagen*, vol. 2. Auflage (ed. D. Ganten and K. Ruckpaul). Heidelberg, New York: Springer Verlag.

- Brockes, J. P., Lemke, G. E. and Balzer, D. R., Jr.** (1980). Purification and preliminary characterization of a glial growth factor from the bovine pituitary. *J Biol Chem* **255**, 8374-7.
- Bunge, R. P.** (1993). Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* **3**, 805-9.
- Buonanno, A. and Fischbach, G. D.** (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 287-96.
- Burden, S. and Yarden, Y.** (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* **18**, 847-55.
- Busfield, S. J., Michnick, D. A., Chickering, T. W., Revett, T. L., Ma, J., Woolf, E. A., Comrack, C. A., Dussault, B. J., Woolf, J., Goodearl, A. D. et al.** (1997). Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus. *Mol Cell Biol* **17**, 4007-14.
- Carraway, K. L., 3rd, Weber, J. L., Unger, M. J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M. and Lai, C.** (1997). Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* **387**, 512-6.
- Carraway, K. r. and Cantley, L. C.** (1994). A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* **78**, 5-8.
- Carraway, K. r., Sliwkowski, M. X., Akita, R., Platko, J. V., Guy, P. M., Nuijens, A., Diamonti, A. J., Vandlen, R. L., Cantley, L. C. and Cerione, R. A.** (1994). The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14303-6.
- Citri, A., Skaria, K. B. and Yarden, Y.** (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* **284**, 54-65.
- Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R. and Jessen, K. R.** (1995). Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* **15**, 585-96.
- Dottori, M., Gross, M. K., Labosky, P. and Goulding, M.** (2001). The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development* **128**, 4127-38.
- Durbec, P. L., Larsson-Blomberg, L. B., Schuchardt, A., Costantini, F. and Pachnis, V.** (1996). Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* **122**, 349-58.
- Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H. and Moore, M. W.** (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development* **124**, 4999-5011.
- Falls, D. L.** (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* **284**, 14-30.
- Falls, D. L., Rosen, K. M., Corfas, G., Lane, W. S. and Fischbach, G. D.** (1993). ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* **72**, 801-15.
- Garratt, A. N., Britsch, S. and Birchmeier, C.** (2000). Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* **22**, 987-96.

- Garratt, A. N., Ozcelik, C. and Birchmeier, C.** (2003). ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med* **13**, 80-6.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R. and Lemke, G.** (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the *erbb4* neuregulin receptor. *Nature* **378**, 390-394.
- Goodearl, A. D., Davis, J. B., Mistry, K., Minghetti, L., Otsu, M., Waterfield, M. D. and Stroobant, P.** (1993). Purification of multiple forms of glial growth factor. *J Biol Chem* **268**, 18095-102.
- Halata, Z., Grim, M. and Bauman, K. I.** (2003). Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec* **271A**, 225-39.
- Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C. and Yarden, Y.** (1999). Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **18**, 2681-9.
- Herbarth, B., Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Hermans-Borgmeyer, I., Puliti, A., Lemort, N., Goossens, M. and Wegner, M.** (1998). Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5161-5.
- Higashiyama, S., Horikawa, M., Yamada, K., Ichino, N., Nakano, N., Nakagawa, T., Miyagawa, J., Matsushita, N., Nagatsu, T., Taniguchi, N. et al.** (1997). A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J Biochem (Tokyo)* **122**, 675-80.
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D. et al.** (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* **256**, 1205-10.
- Howard, M. J., Stanke, M., Schneider, C., Wu, X. and Rohrer, H.** (2000). The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification. *Development* **127**, 4073-81.
- Huotari, M. A., Miettinen, P. J., Palgi, J., Koivisto, T., Ustinov, J., Harari, D., Yarden, Y. and Otonkoski, T.** (2002). ErbB signaling regulates lineage determination of developing pancreatic islet cells in embryonic organ culture. *Endocrinology* **143**, 4437-46.
- Ingham, P. W. and McMahon, A. P.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059-87.
- Inoue, K., Tanabe, Y. and Lupski, J. R.** (1999). Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a SOX10 mutation. *Ann Neurol* **46**, 313-8.
- Jessell, T. M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-9.
- Jessell, T. M., Siegel, R. E. and Fischbach, G. D.** (1979). Induction of acetylcholine receptors on cultured skeletal muscle by a factor extracted from brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5397-401.
- Jessen, K. R. and Mirsky, R.** (2002). Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* **200**, 367-76.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. and Kondoh, H.** (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* **16**, 182-7.

- Kapur, R. P.** (1999). Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol* **2**, 559-69.
- Kim, J., Lo, L., Dormand, E. and Anderson, D. J.** (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* **38**, 17-31.
- King, C. R., Borrello, I., Bellot, F., Comoglio, P. and Schlessinger, J.** (1988). EGF binding to its receptor triggers a rapid tyrosine phosphorylation of the erbB-2 protein in the mammary tumor cell line SK-BR-3. *Embo J.* **7**, 1647-51.
- Kolodkin, A. L.** (1998). Semaphorin-mediated neuronal growth cone guidance. *Prog Brain Res* **117**, 115-32.
- Kramer, R., Bucay, N., Kane, D. J., Martin, L. E., Tarpley, J. E. and Theill, L. E.** (1996). Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4833-8.
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I. and Wegner, M.** (1998a). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* **18**, 237-50.
- Kuhlbrodt, K., Schmidt, C., Sock, E., Pingault, V., Bondurand, N., Goossens, M. and Wegner, M.** (1998b). Functional analysis of Sox10 mutations found in human Waardenburg-Hirschsprung patients. *J Biol Chem* **273**, 23033-8.
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnutgen, F., Bruning, G., Spener, F. and Muller, T.** (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* **120**, 2637-49.
- Lane, P. W. and Liu, H. M.** (1984). Association of megacolon with a new dominant spotting gene (Dom) in the mouse. *J Hered* **75**, 435-9.
- Lang, D., Chen, F., Milewski, R., Li, J., Lu, M. M. and Epstein, J. A.** (2000). Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest* **106**, 963-71.
- Lang, D. and Epstein, J. A.** (2003). Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet* **12**, 937-45.
- Le Douarin, N. and Kalcheim, C.** (1999). *The Neural Crest*: Cambridge University Press.
- Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C. and Hauser, C.** (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development [see comments]. *Nature* **378**, 394-8.
- Lee, K. J. and Jessell, T. M.** (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **22**, 261-94.
- Lemke, G.** (1996). Neuregulins in development. *Mol Cell Neurosci* **7**, 247-62.
- Lemke, G. E. and Brockes, J. P.** (1984). Identification and purification of glial growth factor. *J Neurosci* **4**, 75-83.
- Lewandoski, M.** (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**, 743-55.

- Liu, X., Hwang, H., Cao, L., Buckland, M., Cunningham, A., Chen, J., Chien, K. R., Graham, R. M. and Zhou, M.** (1998). Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13024-9.
- Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F. and Anderson, D. J.** (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* **13**, 1717-28.
- Mahanthappa, N. K., Anton, E. S. and Matthew, W. D.** (1996). Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* **16**, 4673-83.
- Marchionni, M. A., Goodearl, A. D., Chen, M. S., Bermingham, M. O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K. et al.** (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system [see comments]. *Nature* **362**, 312-8.
- Massague, J., Blain, S. W. and Lo, R. S.** (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295-309.
- Meyer, D. and Birchmeier, C.** (1994). Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1064-8.
- Meyer, D. and Birchmeier, C.** (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development [see comments]. *Nature* **378**, 386-90.
- Meyer, D., Yamaai, T., Garratt, A., Riethmacher-Sonneberg, E., Kane, D., Theill, L. and Birchmeier, C.** (1997). Isoform specific expression and function of neuregulin. *Development* **124**, 3575-3586.
- Mollaaghababa, R. and Pavan, W. J.** (2003). The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* **22**, 3024-34.
- Morris, J. K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D. and Lee, K. F.** (1999). Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron* **23**, 273-83.
- Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G. and Anderson, D. J.** (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**, 499-510.
- Mukouyama, Y. S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M. and Anderson, D. J.** (2002). Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* **109**, 693-705.
- Muller, U.** (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* **82**, 3-21.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. and Hynes, N. E.** (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* **19**, 3159-67.
- Ozcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., Hubner, N., Chien, K. R., Birchmeier, C. and Garratt, A. N.** (2002). Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8880-5.

- Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M., Head, C. E., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., Saumarez, R. C., Trezise, A. E., Huang, C. L., Vandenberg, J. I. et al.** (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6210-5.
- Paratore, C., Goerich, D. E., Suter, U., Wegner, M. and Sommer, L.** (2001). Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* **128**, 3949-61.
- Peifer, M. and Polakis, P.** (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* **287**, 1606-9.
- Peirano, R. I., Goerich, D. E., Riethmacher, D. and Wegner, M.** (2000). Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol Cell Biol* **20**, 3198-209.
- Peirano, R. I. and Wegner, M.** (2000). The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res* **28**, 3047-55.
- Peles, E., Ben, L. R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D. and Yarden, Y.** (1993). Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/hereregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *Embo J.* **12**, 961-71.
- Pevny, L. H. and Lovell-Badge, R.** (1997). Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 338-44.
- Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Prehu, M. O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G. et al.** (1998). SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* **18**, 171-3.
- Pingault, V., Bondurand, N., Le Caignec, C., Tardieu, S., Lemort, N., Dubourg, O., Le Guern, E., Goossens, M. and Boespflug-Tanguy, O.** (2001). The SOX10 transcription factor: evaluation as a candidate gene for central and peripheral hereditary myelin disorders. *J Neurol* **248**, 496-9.
- Pingault, V., Guiochon-Mantel, A., Bondurand, N., Faure, C., Lacroix, C., Lyonnet, S., Goossens, M. and Landrieu, P.** (2000). Peripheral neuropathy with hypomyelination, chronic intestinal pseudo-obstruction and deafness: a developmental "neural crest syndrome" related to a SOX10 mutation. *Ann Neurol* **48**, 671-6.
- Plowman, G. D., Green, J. M., Culouscou, J. M., Carlton, G. W., Rothwell, V. M. and Buckley, S.** (1993). Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* **366**, 473-5.
- Price, S. R., De Marco Garcia, N. V., Ranscht, B. and Jessell, T. M.** (2002). Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins. *Cell* **109**, 205-16.
- Pusch, C., Hustert, E., Pfeifer, D., Sudbeck, P., Kist, R., Roe, B., Wang, Z., Balling, R., Blin, N. and Scherer, G.** (1998). The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet* **103**, 115-23.
- Raff, M. C., Abney, E., Brockes, J. P. and Hornby-Smith, A.** (1978). Schwann cell growth factors. *Cell* **15**, 813-22.

- Reissmann, E., Ernsberger, U., Francis-West, P. H., Rueger, D., Brickell, P. M. and Rohrer, H.** (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* **122**, 2079-88.
- Riethmacher, D., Sonnenberg, R. E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R. and Birchmeier, C.** (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* **389**, 725-30.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25.
- Schneider, C., Wicht, H., Enderich, J., Wegner, M. and Rohrer, H.** (1999). Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* **24**, 861-70.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F. and Pachnis, V.** (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* **367**, 380-3.
- Shah, N. M., Groves, A. K. and Anderson, D. J.** (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* **85**, 331-43.
- Shima, D. T. and Mailhos, C.** (2000). Vascular developmental biology: getting nervous. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 536-42.
- Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L. and Carraway, K. r.** (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14661-5.
- Southard-Smith, E. M., Kos, L. and Pavan, W. J.** (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* **18**, 60-4.
- Spokony, R. F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E. and Saint-Jeannet, J. P.** (2002). The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development* **129**, 421-32.
- Suter, U. and Scherer, S. S.** (2003). Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* **4**, 714-26.
- Szedler, V., Grim, M., Halata, Z. and Sieber-Blum, M.** (2003). Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev Biol* **253**, 258-63.
- Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M. and Yagi, T.** (1997). Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* **19**, 519-30.
- Thomas, S. A., Matsumoto, A. M. and Palmiter, R. D.** (1995). Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature* **374**, 643-6.
- Touraine, R. L., Attie-Bitach, T., Manceau, E., Korsch, E., Sarda, P., Pingault, V., Encha-Razavi, F., Pelet, A., Auge, J., Nivelon-Chevallier, A. et al.** (2000). Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet* **66**, 1496-503.
- Tzahar, E., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Yi, L., Peles, E., Lavi, S., Chang, D., Liu, N. L., Yayon, A., Wen, D. Z. et al.** (1994). Erbb-3 and erbb-4 function as the respective low and high affinity receptors of all neu differentiation factor heregulin isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 25226-25233.

- Wakamatsu, Y., Maynard, T. M. and Weston, J. A.** (2000). Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development* **127**, 2811-21.
- Wallasch, C., Weiss, F. U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W. and Ullrich, A.** (1995). Heregulin-dependent regulation of her2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with her3. *Embo Journal* **14**, 4267-4275.
- Wang, S. and Barres, B. A.** (2000). Up a notch: instructing gliogenesis. *Neuron* **27**, 197-200.
- Wegner, M.** (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* **27**, 1409-20.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J. and Lemke, G.** (1991). A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* **113**, 199-205.
- Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S. V., Bacus, S. S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S. M., Levy, R. B. et al.** (1992). Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* **69**, 559-72.
- Wilson, M. and Koopman, P.** (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 441-6.
- Woldeyesus, M. T., Britsch, S., Riethmacher, D., Xu, L., Sonnenberg-Riethmacher, E., Abou-Rebyeh, F., Harvey, R., Caroni, P. and Birchmeier, C.** (1999). Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* **13**, 2538-48.
- Wolpowitz, D., Mason, T. B., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D. A. and Role, L. W.** (2000). Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* **25**, 79-91.
- Yamamoto, Y., Livet, J., Pollock, R. A., Garcés, A., Arce, V., deLapeyriere, O. and Henderson, C. E.** (1997). Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development* **124**, 2903-13.
- Yang, X., Kuo, Y., Devay, P., Yu, C. and Role, L.** (1998). A cysteine-rich isoform of neuregulin controls the level of expression of neuronal nicotinic receptor channels during synaptogenesis. *Neuron* **20**, 255-70.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X.** (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-37.
- Zhang, D., Sliwkowski, M. X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J. and Godowski, P. J.** (1997). Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9562-7.
- Zhou, Q. Y., Quaife, C. J. and Palmiter, R. D.** (1995). Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* **374**, 640-3.

6. Anhang

6.1 Lebenslauf

Dr. med. Stefan Britsch

geboren am: 07.08.1962 in Oberndorf am Neckar, Baden Württemberg
verheiratet mit: Dr. Pascale Britsch, Fachärztin für Psychiatrie und Psychotherapie
Kinder: Clemens, geb. 25.01.2002
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

9/73 – 5/82 Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium am Rosenberg
in Oberndorf am Neckar
5/82 Abitur, Gymnasium am Rosenberg in Oberndorf
(Leistungsfächer: Chemie und Biologie)

Zivildienst

9/82 – 12/83 Betreuung und Unterricht lernbehinderter Kinder an der Ivo-Frueth-Schule in
Oberndorf am Neckar
Mobiler sozialer Hilfsdienst bei der Arbeiterwohlfahrt in Rottweil

Berufspraktikum

5/84 – 9/84 Friedrich Husemann-Klinik für Neurologie und Psychiatrie in Buchenbach i. Br.

Akademischer Werdegang

10/84 - 5/91 Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
2/89 - 4/89 Auslandsstudienaufenthalt an den Departments of Surgery and Anaesthesiology,
Providence Memorial Hospital, El Paso, Texas
12/90 - 3/91 Auslandsstudienaufenthalt am Department Innere Medizin, Kantonsspital
Basel/Bruderholz, Schweiz
5/91 Ärztliche Prüfung und Teilapprobation als Arzt
8/92 Promotion an der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
bei Prof. Dr. B. Christ (*summa cum laude*)

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

- 4/92 – 9/93 Arzt im Praktikum an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abtlg. Gastroenterologie und Hepatologie, Direktor: Prof. Dr. Michael Gregor
- 10/93 Approbation als Arzt
- 10/93 – 3/96 Assistenzarzt an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abtlg. Gastroenterologie und Hepatologie, Direktor: Prof. Dr. Michael Gregor

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

- 10/88 - 8/92 Doktorand bei Prof. Dr. Bodo Christ, Anatomisches Institut II der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- 8/93 - 4/94 Gastaufenthalt am Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, AG Prof. Dr. Gisela Drews
- 4/96 – 11/02 Postdoc am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin – MDC Berlin-Buch, AG Prof. Dr. Carmen Birchmeier
- seit 12/02 Helmholtz-Stipendiat und Nachwuchsgruppenleiter am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin – MDC Berlin-Buch

Forschungsschwerpunkte

- Neuregulin/ErbB Signalsystem
- Molekulare Mechanismen der Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems
- Mausgenetik

Stipendien und Preise

- 1987 – 1991 Stipendiat der *Studienstiftung des deutschen Volkes*
- 1993 Promotions-Preis der *Wissenschaftlichen Gesellschaft Freiburg*
- 1996 - 1998 MDC-Postdoc-Stipendium
- 2002 Helmholtz Stipendium

Akademische Lehrtätigkeit

- 1998 - 2002 Praktikum Molekulare Zellbiologie für Naturwissenschaftler (1-wöchiges, ganztägiges Semesterpraktikum, HU Berlin)
- Seit SS 2001 Kursus der Makroskopischen Anatomie (5 Semesterwochenstunden, Medizinische Fakultät, HU Berlin)
- Seit SS 2001 Kursus der Mikroskopischen Anatomie (3 Semesterwochenstunden, Medizinische Fakultät, HU Berlin)

Einwerbung von Drittmitteln

Name	Förderer	Projekt	Laufzeit	Gesamtsumme
C. Birchmeier, S. Britsch	DFG	Molecular control of cell migration (SPP: Molekulare Steuerungs- mechanismen der Zellwanderung 2. Förderperiode)	07/00-06/02	DM 344.000
C. Birchmeier, S. Britsch	DFG	Molecular control of cell migration (SPP: Molekulare Steuerungs- mechanismen der Zellwanderung 3. Förderperiode)	04/02-04/04	Euro 202.000

6.2 Wissenschaftlicher Werdegang

Den ersten Kontakt mit wissenschaftlichem Arbeiten und meinem späteren, eigenen wissenschaftlichen Arbeitsfeld hatte ich während meines vorklinischen Studiums der Humanmedizin als studentischer Mitarbeiter in der damaligen Arbeitsgruppe für *Experimentelle Embryologie* von Prof. Dr. Bodo Christ am Anatomischen Institut der Ruhr Universität Bochum. Dort erlernte ich neben grundlegenden morphologischen Untersuchungsmethoden die Anwendung experimentell-embryologischer Techniken wie z. B. die Erzeugung von Huhn-Wachtel Chimären. Aus dieser Mitarbeit ging außerdem meine Dissertation über das Thema „Morphologische und experimentelle Untersuchungen zur Entwicklung des Gefäßsystems bei der Wachtel-Chorioallantois“ hervor, die ich 1992 mit dem Prädikat *summa cum laude* abschloß. Ich konnte am Modell der Chorioallantois experimentell zeigen, daß Blutgefäß-Fibronektin Interaktionen essentiell sind für die embryonale Entwicklung des Chorioallantois-Gefäßsystems. Werden derartige Interaktionen mit Hilfe von synthetischen Peptiden oder spezifischen Antikörpern, die mit der Bindung von Zellen an Fibronektin interferieren, gestört, entwickelt sich ein hypo- bis aplastisches, in seiner organotypischen Musterbildung gestörtes Blutgefäßsystem (Britsch et al., 1989, Britsch, 1992). Meine Arbeiten wurden 1993 mit dem Preis der *Wissenschaftlichen Gesellschaft in Freiburg im Breisgau* ausgezeichnet.

Nach Abschluß meines Medizinstudiums wechselte ich für meine klinisch-medizinische Ausbildung als Arzt zu Prof. Dr. med. Michael Gregor an die Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Universität Tübingen. Neben meiner internistischen Ausbildung war ich dort auch wissenschaftlich tätig. Im Rahmen eines DFG-geförderten Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gisela Drews am Physiologischen Institut der Universität Tübingen beschäftigte ich mich mit der Aufklärung des Wirkmechanismus des intestinalen Hormons Glucagon-like-Peptide-1 (GLP-1) auf die glukoseabhängige Insulinsekretion von B-Zellen des Pankreas. Mit Hilfe von intrazellulären elektrischen Ableitungen und Patch-Clamp Untersuchungen an B-Zellen konnte ich dabei zeigen, daß GLP-1 die elektrische Aktivität von Pankreas B-Zellen -

entgegen früherer Auffassungen unabhängig von K^+ _{ATP} Kanälen - durch eine verlangsamte, cAMP-vermittelte Inaktivierung von Ca^{2+} Kanälen steigert. Dieser Effekt führt zu einer Steigerung der glukoseabhängigen Insulinsekretion (Britsch et al., 1995; 1996).

Um meine entwicklungsbiologischen Interessen weiterverfolgen zu können, wechselte ich - unterstützt durch ein Postdoc-Stipendium - 1996 an das Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch zur Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carmen Birchmeier. Das Labor von Prof. Birchmeier ist eines der führenden Labore in der Erforschung der entwicklungsbiologischen Funktionen von Tyrosinkinase-Rezeptoren mit Hilfe von Knockout Mäusen. Viele dieser Moleküle spielen nicht nur eine Rolle während der Embryonalentwicklung sondern auch bei der Entstehung von grundlegenden Krankheitsprozessen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Birchmeier war daher eine ideale Umgebung zur Verknüpfung meiner grundlagenorientierten entwicklungsbiologischen Interessen mit meiner medizinischen Ausbildung.

Während meiner Postdoc-Zeit am MDC beschäftigte ich mich vor allem mit der Aufklärung der entwicklungsbiologischen Funktionen des EGF-ähnlichen Signalmoleküls Neuregulin-1 und seiner spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptoren ErbB2 und ErbB3. Beide Rezeptoren werden während der Embryogenese u. a. von undifferenzierten Neuralleistenzellen und ihren Derivaten exprimiert. Mäuse mit gezielten Mutationen in den Genen für Neuregulin-1, ErbB2 oder ErbB3 entwickeln eine schwere Hypoplasie des sympathischen Nervensystems. Ich konnte zeigen, daß Neuregulin-1 Signale essentiell sind für die Steuerung und Aufrechterhaltung des Migrationsverhaltens von sympathogenen Neuralleistenzellen. In Abwesenheit von Neuregulin-1 oder seiner spezifischen Rezeptoren verlieren diese Zellen die Fähigkeit, in ihre charakteristischen Zielregionen einzuwandern und verharren stattdessen in der Umgebung des Neuralrohrs wo sie gebildet werden (Britsch et al., 1998). Diese Beobachtungen haben zum ersten Mal eine direkte Rolle von Tyrosinkinase-Rezeptor-vermittelten Signalen bei der Steuerung von Zellmotilität demonstriert, sie wurden im Rahmen

des Schwerpunktprogramms „Molekulare Steuerungsmechanismen der Zellwanderung“ von der DFG gefördert.

Neben diesen Untersuchungen habe ich mich mit der Identifizierung von Genen beschäftigt, die genetisch mit Komponenten des Neuregulin-1/ErbB Signalsystems interagieren. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Wegner, Universität Erlangen, konnte ich zeigen, daß der HMG-Box Transkriptionsfaktor Sox10 *in vivo* die Expression von erbB3 kontrolliert. Sox10 und erbB3 sind in Neuralleistenzellen und ihren Derivaten koexprimiert. Mäuse mit Mutationen im sox10 und erbB3 Gen besitzen daher überlappende Phänotypen (Britsch et al., 2001). Darüber hinaus konnte ich eine weitere zentrale Funktion von Sox10 während der Embryogenese charakterisieren: Sox10 ist – unabhängig von ErbB3-vermittelten Signalen – ein Schlüsselmolekül bei der Entwicklung von Gliazellen des peripheren Nervensystems und steuert die Differenzierung der gesamten Gliazell *lineage* aus undifferenzierten Neuralleistenzellen. Die homozygote Mutation des sox10 Gens in Mäusen führt daher zum vollständigen Verlust peripherer Glia (Britsch et al., 2001). Interessanterweise entwickeln Mäuse in Abwesenheit peripherer Gliazellen das Bild einer peripheren Neuropathie mit progredientem Untergang von sensorischen und Motoneuronen. Ich konnte in meinen eigenen Arbeiten und in Zusammenarbeit mit Dr. Mas Woldeyesus aus der Arbeitsgruppe von Prof. Carmen Birchmeier zeigen, daß diese Neuropathie direkt verursacht wird durch das Fehlen von Gliazellen in der Umgebung betroffener Nerven (Britsch et al., 2001; Woldeyesus et al., 1999).

Im Dezember 2002 wurde ich als Helmholtz-Stipendiat auf eine Nachwuchsgruppenleiterstelle in der Abteilung von Prof. Dr. Carmen Birchmeier am MDC berufen. Meine gegenwärtige wissenschaftliche Arbeit konzentriert sich weiterhin auf die Erforschung molekularer Steuerungsmechanismen der Entwicklung des Nervensystems, insbesondere auf die Identifizierung differentiell exprimierter, neuer Gene während der Entwicklung von Neuralrohr und Spinalganglien. Mit Hilfe Microarray-gestützter globaler Expressionsanalysen ist es uns gelungen, neue Gene mit potentiellen Steuerungsfunktionen in der Entwicklung zu identifizieren. Wir haben damit begonnen, ausgewählte, neue

Kandidatengene durch Gene Targeting in der Maus zu inaktivieren und funktionell zu charakterisieren.

6.3 Publikationsverzeichnis

A. Originalarbeiten

(Summe der impact factor Punkte: 145,497)

Britsch S, Christ B and Jacob HJ (1989) The influence of cell-matrix interactions on the development of quail chorioallantoic vascular system. *Anat Embryol* 180: 479-484 (impact factor: 1.511)

Britsch S (1992) Morphologische und experimentelle Untersuchungen zur Entwicklung des Gefäßsystems bei der Wachtel-Chorioallantois. *Inauguraldissertation*, Freiburg 1992

Krippeit-Drews P, Britsch S, Lang F and Drews G (1994) Effects of SH-group reagents on Ca^{2+} and K^{+} channel currents of pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 860-866 (impact factor: 3.161)

Britsch S, Krippeit-Drews P, Gregor M Lang F and Drews G (1994) Effects of osmotic changes in extracellular solution on electrical activity of mouse pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 641-645 (impact factor: 3.161)

Britsch S, Krippeit-Drews P, Lang F, Gregor M and Drews G (1995) Glucagon-like-peptide-1 modulates Ca^{2+} current but not K^{+} current in intact mouse pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 33-39 (impact factor: 3.161)

Britsch S, Krippeit-Drews P, Gregor M, Lang F and Drews G (1996) Effects of Glucagon-like-peptide-1 on membrane potential and ion channels of mouse pancreatic beta-cells. *Acta Physiol Scand* 157: 353 (impact factor: 1.411)

Krippeit-Drews P, Britsch S, Lang F, Drews G (1997) Effects of oxidants on membrane potential, K^{+} and Ca^{2+} currents of mouse pancreatic B-cells. *Adv Exp Med Biol* 426: 355-359 (impact factor: 0.446)

Drews G, Zempel G, Krippeit-Drews P, Britsch S, Busch GL, Lang F (1998) Ion channels involved in insulin release are activated by osmotic swelling of pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta* 1370: 8-16 (impact factor: 2.590)

Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring F, Brinkmann, V, Birchmeier C, Riethmacher D (1998) The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand neuregulin-1 are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 12: 1825-1836 (impact factor: 19.220)

Woldeyesus MT, Britsch S, Riethmacher D, Xu L, Sonnenberg-Riethmacher E, Abou-Rebyeh F, Harvey R, Caroni P and Birchmeier C (1999) Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* 13: 2538-2548 (impact factor: 19.220)

- Gaio U, Schweikert A, Fischer A, Garratt AN, Müller T, Özcelik C, Lankes W, Strehle M, Britsch S, Blum M, Birchmeier C** (1999) A role of the cryptic gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr Biol* 9: 1339-1342 (impact factor: 8.733)
- Garratt AN, Britsch S, Birchmeier, C** (2000) Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell. *Bioessays* 22: 987-996 (impact factor: 7.649)
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, D, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M** (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15: 66-78 (impact factor: 19.220)
- Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalio K, Birchmeier W** (2001) Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* 154: 345-354 (impact factor: 12.785)
- Özcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschurek N, Britsch S, Hübner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN** (2002) Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *PNAS* 99: 8880-8885 (impact factor: 10.789)
- Mukouyama Y, Shin D, Britsch S, Taniguchi M, Anderson DJ** (2002) Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109: 693-705. (impact factor: 32.440)
- Li L, Müller T, Strehle M, Gaio U, Strotmann J, Breer H, Britsch S, Birchmeier C** (2002) Neuregulin-1 and its receptors, ErbB2/ErbB3, are required for the establishment of the correct topographic map in the olfactory system. (*in rev.*)

B. Buchbeiträge

- Krippeit-Drews P, Britsch S, Lang F and Drews G** (1995) Effects of oxidants on membrane potential, K^+ and Ca^{2+} currents of mouse pancreatic B-cells. In: Soria B (ed.) *Physiology and Pathophysiology of the Islets of Langerhans*. Plenum Press
- Birchmeier C, Bladt F und Britsch S** (1997) Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung. In: Ganten D, Ruckpaul K (eds.) *Handbuch der Molekularen Medizin, Bd. 1, Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*. S. 338-358. Springer-Verlag, Heidelberg, New York
- Britsch S, Strehle M, Birchmeier C** (2003) Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung. Neu bearbeitete und erweiterte Fassung. In: Ganten D, Ruckpaul K (eds.) *Handbuch der Molekularen Medizin, Bd. 1, Molekular- und Zellbiologische Grundlagen. 2. Auflage*. Springer-Verlag, Heidelberg, New York.
- Britsch S (2003)** Transgenic and Knockout Animals. In: Ganten D, Ruckpaul K (eds.) *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. Springer-Verlag, Heidelberg, New York. (*im Druck*)

C. Gutachten

Birchmeier C und Britsch S (1998) Chancen und Risiken der Entwicklung und Anwendung des Klonens sowie der Gentechnik und Reproduktionstechnik bei der Züchtung von Tieren für die biomedizinische Forschung. (Gutachten für das Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag)

7. Ausgewählte Publikationen

7.1 The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system

Stefan Britsch, Li Li, Susanne Kirchhoff, Franz Theuring, Volker Brinkmann, Carmen Birchmeier, and Dieter Riethmacher

Genes & Development 12:1825-1836. 1998

<http://www.genesdev.org/cgi/content/full/12/12/1825>

7.2 Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants Following genetic rescue of heart development

**Masresha T. Woldeyesus, Stefan Britsch, Dieter Riethmacher, Lan Xu, Eva
Sonnenberg-Riethmacher, Faikah Abou-Rebyeh, Richard Harvey, Pico Caroni,
and Carmen Birchmeier**

***Genes & Development* 13:2538-2548. 1999**

<http://www.genesdev.org/cgi/content/full/13/19/2538>

7.3 The transcription factor Sox10 is a key regulator of Peripheral glial development

Stefan Britsch, Derk E. Goerich, Dieter Riethmacher, Reto I. Peirano, Moritz Rossner, Klaus-Armin Nave, Carmen Birchmeier, and Michael Wegner

***Genes & Development* 15:66-78. 2001**

<http://www.genesdev.org/cgi/content/full/15/1/66>

7.4 Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy

Cemil Özcelik, Bettina Erdmann, Bernhard Pilz, Nina Wettschurek, Stefan Britsch, Norbert Hübner, Kenneth R. Chien, Carmen Birchmeier, Alistai Garratt

***PNAS* 99:8880-8885. 2002**

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

7.5 Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell

Alistair N. Garratt, Stefan Britsch and Carmen Birchmeier

***BioEssays* 22:987-996. 2000**

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/74500202/ABSTRACT>

7.6 Sensory Nerves Determine the Pattern of Arterial Differentiation and Blood Vessel Branching in the Skin

Yoh-suke Mukoyama, Donghun Shin, Stefan Britsch, Masahiko Taniguchi, and David J. Anderson

***Cell* 109:693-705. 2002**

<http://www.cell.com/content/article/abstract?uid=PIIS0092867402007572>

8. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt vor allen zwei Personen, Frau Professor Dr. Carmen Birchmeier und Herrn Professor Dr. Robert Nitsch – ohne ihre großzügige, uneingeschränkte Unterstützung wären meine wissenschaftliche Arbeit und mein Entschluß zur Habilitation im Fach Anatomie nicht realisierbar gewesen.

Sehr herzlich möchte ich meiner wissenschaftlichen Lehrerin, Frau Professor Dr. Carmen Birchmeier, danken: Dafür daß Sie mir überaus großzügig und unter Zurückstellung eigener Interessen die Möglichkeit gab, mich wissenschaftlich zu entwickeln, sowie dafür, daß ich während der vergangenen drei Jahre einen Teil meiner Arbeitskraft in die Lehre im Fach Anatomie investieren konnte.

Herrn Professor Dr. Robert Nitsch möchte ich ganz besonders für die herzliche Aufnahme und das entgegengebrachte Vertrauen während der Betreuung meines Habilitationsverfahrens danken. Dies hat mir, als externem Habilitanden, den Weg in der Anatomie sehr erleichtert.

Mein herzlicher und persönlicher Dank gilt meinem ehemaligen Doktorvater, Herrn Professor Dr. Bodo Christ, der es in gewisser Weise *zu verantworten* hat, daß mich Anatomie und Entwicklungsbiologie nicht mehr losgelassen haben.

Herzlich danken möchte ich den Herren Prof. Dr. Bernd Heimrich, Prof. Dr. Ingo Bechmann und Prof. Dr. Thomas Ohm für ihre große Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Aufnahme im Rahmen des Anatomieunterrichts an der Charité.

Mein Dank gilt außerdem all meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Carmen Birchmeier am MDC für ihre fachliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Herzlich danken möchte ich außerdem Frau Verena Sasse für ihre außergewöhnliche Einsatzbereitschaft und große Hilfe während der letzten Jahre.

Schließlich danke ich Euch, Pascale und Clemens, von ganzem Herzen für Eure Liebe, Eure Unterstützung und Geduld.

9. Erklärungen, einschließlich eidesstattlicher Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig verfaßt. Insgesamt werden die Forschungsergebnisse aus fünf publizierten Arbeiten, sowie eine Übersichtsarbeit dargestellt. Alle dargestellten Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit den entwicklungsbiologischen Funktionen des NRG-1/ErbB-Signalsystems und seines Interaktionspartners Sox10. 5 der dargestellten Arbeiten sind in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Carmen Birchmeier am Max Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch entstanden, davon zwei in Erstautorenschaft (Britsch et al., 1998; Britsch et al., 2001). Eine Arbeit (Mukouyama et al., 2002) entstammt einer Kooperation mit dem Labor von David Anderson (California Institute of Technology, Pasadena). Die Arbeit Woldeyesus, Britsch et al., 1999 umfaßt ein Forschungsprojekt, das ich in enger Kooperation mit Herrn Dr. Mas Woldeyesus (vormals AG Prof. Dr. Carmen Birchmeier, z. Zt. Karolinska Institut, Schweden) durchgeführt habe, ferner wird eine Übersichtsarbeit (Garratt, Britsch und Birchmeier, 2000), die in Kooperation mit meinem Kollegen Herrn Dr. Alistair Garratt aus der Gruppe von Frau Professor Birchmeier verfaßt wurde, und eine Arbeit, die in Kooperation mit Dr. med. Cemil Özcelik entstand (Özcelik et al., 2002) dargestellt.

Neben den genannten Kollegen waren Professor Dr. Michael Wegner (Universität Erlangen) und Dr. Dieter Riethmacher (ZMNH, Hamburg) wichtige Kooperationspartner.

Alle weiteren an den jeweiligen Arbeiten beteiligten Mitarbeiter und Kooperationspartner, sowie verwendete Hilfsmittel sind in den beigefügten Sonderdrucken im Detail und vollständig aufgeführt.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift