

Biologie

**Strukturelle und funktionelle Analyse des
Signalmoleküls Sema3A**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Claudia Hömme

aus Hagen a.T.W.

- 2005 -

Dekan:	Prof. Dr. Alexander Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Andreas W. Püschel
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Volker Gerke
Tag der mündlichen Prüfung:	14.07.2005.....
Tag der Promotion:	22.07.2005.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Molekulare Mechanismen der axonalen Wegfindung	2
1.2 Die Semaphorine	4
1.2.1 Die Proteinfamilie der Semaphorine	4
1.2.2 Die Funktion von Semaphorinen in der Entwicklung des Nervensystems	6
1.2.3 Rezeptoren für Klasse 3 Semaphorine	8
1.2.4 Strukturelle Merkmale von Sema3A und seinem Rezeptor	10
1.2.5 Signaltransduktions-Kaskade des Sema3A-Rezeptors.....	12
1.2.6 Die Rolle von GTPasen im Plexin-vermittelten Signalweg.....	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Medien, Nährböden und Lösungen für Bakterienkulturen.....	22
2.1.4 Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	23
2.1.5 Material für molekularbiologische Methoden.....	24
2.1.6 Lösungen für biochemische Methoden	25
2.1.7 Material für biochemische Methoden	28
2.1.8 Medien und Lösungen für die Zellkultur	28
2.1.9 Material für die Zellkultur.....	31
2.1.10 Bakterienstämme.....	31
2.1.11 Zelllinien	31
2.1.12 Plasmide	32
2.1.13 Synthetische Oligonukleotide	33
2.1.14 Antikörper	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse.....	34
2.2.1.2 Isolierung von DNA im präparativen Maßstab	35

2.2.1.3	Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA	35
2.2.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.5	DNA-Gelelektrophorese.....	35
2.2.1.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
2.2.1.7	Dephosphorylierung linearisierter DNA	36
2.2.1.8	Phosphorylierung und Auffüllen von 5' DNA-Enden	37
2.2.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.2.1.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.1.11	Isolierung von RNA	38
2.2.1.12	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	38
2.2.1.13	Sequenzierung von DNA	38
2.2.1.14	Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation	39
2.2.1.15	Transformation durch Elektroporation.....	39
2.2.2	Konstruktion von Expressionsvektoren	39
2.2.2.1	Klonierung von AP-Sema3A Δ 3	39
2.2.2.2	Konstruktion von Sema3A-P1	40
2.2.2.3	Klonierung der GST-RhoD „Effektor loop“ Mutanten.....	40
2.2.2.4	Klonierung von GST-Dia2C-GBD.....	41
2.2.3	Proteinbiochemie.....	41
2.2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten	41
2.2.3.2	Expression von GST-Fusionsproteinen.....	41
2.2.3.3	Aufschluss von Bakterienkulturen	42
2.2.3.4	Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose.....	42
2.2.3.5	Beladung von GST-GTPasen mit GTP γ S	42
2.2.3.6	„Pulldown“-Assay	43
2.2.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.3.8	Coomassie-Färbung von Proteinen	44
2.2.3.9	Western-Blot	44
2.2.3.10	Immundetektion von Proteinen	44
2.2.4	Zellkultur.....	45
2.2.4.1	Auftauen von Zellen.....	45
2.2.4.2	Kultivierung von Zellen	45
2.2.4.3	Kryokonservierung von Zellen.....	46
2.2.4.4	Transfektion von Zellen	46

2.2.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz	47
2.2.4.6	Gewinnung von rekombinantem AP-Sema3A	48
2.2.4.7	AP-Assay zur Bestimmung der Sema3A-Konzentration	48
2.2.4.8	Nrp-1 Bindungs-Assay	49
2.2.4.9	Quantitativer Nrp-1 Bindungs-Assay	49
2.2.4.10	COS-7 Kollaps-Assay	50
2.2.4.11	Shep-SF Kollaps-Assay	50
2.2.4.12	Isolierung von Membranfraktionen aus COS-7 Zellen	51
2.2.5	Fluoreszenzspektroskopische Messung der GTP-Hydrolyse	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Kristallstruktur-basierende Analyse von Sema3A	53
3.1.1	Bestimmung der biologischen Aktivität von Sema3A-65K	53
3.1.2	Kristallstruktur von Sema3A-65K	55
3.1.3	Identifizierung der Interaktionsstelle von Sema3A für Nrp-1	56
3.1.4	Analyse einer potentiellen Plexin-Bindungsstelle von Sema3A	58
3.2	Analyse der Sema3A-induzierten Signalkaskade	67
3.2.1	Etablierung einer Sema3A-sensitiven Zelllinie	67
3.2.2	Analyse der Funktion von RhoD	70
3.2.3	Analyse der potentiellen GAP-Aktivität von Plexin-A1	79
4	Diskussion	82
4.1	Strukturelle und funktionelle Analyse von Sema3A	82
4.1.1	Kristallstruktur-basierende Analyse von Sema3A	82
4.1.2	Analyse der Sema3A-induzierten Signalkaskade	91
4.1.2.1	Etablierung einer Sema3A-sensitiven Zelllinie	91
4.1.2.2	Analyse der Funktion von RhoD	91
4.1.2.3	Untersuchung der potentiellen GAP-Aktivität von Plexin-A1	97
5	Zusammenfassung	100
6	Referenzen	102
	Anhang	112

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampère
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Amoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
b	Base
bidest.	Doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CAM	Cell Adhesion Molecule
Cdk5	cyclin-dependent kinase
cDNA	Komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosintriophosphat
CRAM	CRMP-Associated Molecule
CRMP	Collapsin Response Mediator Protein
Δ	Delta
Da	Dalton
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drf	Diaphanous-related Formin
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GBD	GTPase-Bindedomäne
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	Green fluorescent protein
GSK3β	Glycogen synthetase Kinase 3β
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde(n)
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
Ig-Domäne	Immunglobulin-ähnliche Domäne
IPT-Domäne	Plexin/Semaphorin/Integrin-Domäne
k	Kilo
l	Liter
LB	Luria Bertani
LOX	Lipooxygenase
Lsg.	Lösung
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEM	Minimum Essential Medium

min	Minute
MRS	MET related sequence
n	Nano
N-CAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
Nrp	Neuropilin
OD	Optische Dichte
OTK	Off-track
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAK	p21-activated kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rho	Ras homolog
Robo	Roundabout
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
sec	Sekunde(n)
Sema3A	Semaphorin 3A
SDS	Sodium-dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Im Jahre 1893 konnte der italienische Histologe Camillo Golgi durch Färbetechniken mit Silbernitrat im Gehirngewebe einzelne Nervenzellen mit Zellkörper und feinen Fortsätzen darstellen (kurze Dendriten und ein längeres Axon). Er nahm an, dass die Endverzweigungen der Axone zusammen mit anderen Nervenzellen ein zusammenhängendes Kommunikationsnetzwerk bilden (Reticulartheorie). Der spanische Mediziner Santiago Ramón y Cajal verbesserte Golgis Silbernitratfärbung und untersuchte mit ihrer Hilfe die Verbindungen zwischen Nervenzellen. Er postulierte, dass die Dendriten Informationen empfangen, die durch das Axon weitergeleitet werden. Cajal widerlegte die Reticulartheorie, indem er nachwies, dass die Endverzweigungen der Axone keine Verbindungen mit Teilen anderer Zellen eingehen. Die Neurone tauschen untereinander über spezifische Kontaktstellen, die der englische Neuropsychologe Charles Sherrington als Synapsen bezeichnete, Signale aus und verarbeiten sie. Damit entstand die Neuronentheorie, nach der Neurone die fundamentale Übertragungseinheit im Nervensystem sind.

Heute wissen wir, dass das menschliche Nervensystem aus etwa 10^{12} Neuronen mit über 10^{15} spezifischen synaptischen Verbindungen besteht. Die Verschaltung der Nervenzellen beginnt, wenn Neurone im sich entwickelnden embryonalen Nervensystem ein Axon ausbilden, das dann zu seinem Ziel gelenkt wird. Die Richtung, in die das Axon wandert, wird durch den Wachstumskegel an der Spitze des Axons bestimmt. 1892 vermutete Ramón y Cajal, dass sich Nervenfortsätze bei ihrem Wachstum an chemischen Gradienten orientieren. Die Natur dieser chemischen Substanzen war allerdings unklar. 1963 formulierte dann R.W. Sperry die Chemoaffinitätstheorie (Sperry, 1963), nach der Axone ihre Zielzellen aufgrund von Faktoren auf dem Wachstumskegel, entlang der Wegstrecke und auf den Zielzellen erkennen. Basis für diese Hypothese waren Experimente an der Retina von Amphibien. Die Signalmoleküle, durch die Axone geleitet werden, wurden allerdings erst sehr viel später identifiziert. Inzwischen ist klar, dass es neben diesem aktivitätsunabhängigen, genetisch festgelegten Steuerungsmechanismus aktivitätsabhängige Mechanismen gibt, die meist in einer späteren Phase bei der Verfeinerung von Projektionsmustern und bei der Entwicklung von Synapsen beteiligt sind (Goodman and Shatz, 1993; Mueller, 1999; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

Die Projektion der Axone zu ihren Zielzellen ist in kleinere Segmente über einige Hundert Mikrometer unterteilt und wird von intermediären Zielen oder in Insekten von so genannten „Guidepost cells“ gesteuert. Erreichen Wachstumskegel solche Zellen, verlangsamen die

Axone ihr Wachstum, und die Wachstumskegel nehmen eine komplexere, Filopodien-reiche Struktur an (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

Wachstumskegel haben eine essentielle Funktion während der Navigation von Axonen. Sie besitzen eine sehr bewegliche Struktur, die durch zwei Arten von Zytoskelettelementen bestimmt wird. In der zentralen Region (C) des Wachstumskegels befinden sich überwiegend Mikrotubuli. In der peripheren Region (P) herrschen Aktinfilamente vor, die die Dynamik der Wachstumskegel gewährleisten. Sie liegen in den fingerartigen Ausläufern, den Filopodien gebündelt vor und bilden in den Lamellipodien ein enges Netzwerk (Abb. 1; Gordon-Weeks und Mansfield, 1992; Mueller, 1999).

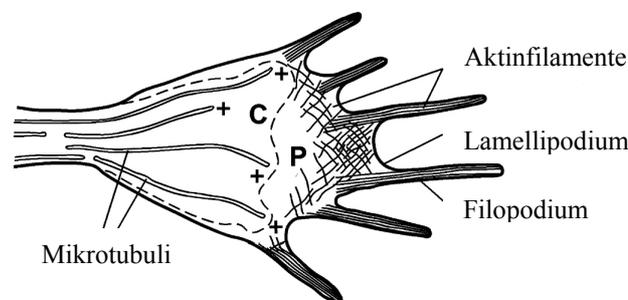


Abb. 1: Der axonale Wachstumskegel. Zwei Sorten von Zytoskelettelementen herrschen in Wachstumskegeln vor. In der zentralen Region (C) befinden sich überwiegend Mikrotubuli. Die wachsenden Enden der Mikrotubuli sind mit einem Pluszeichen gekennzeichnet. In der peripheren Region (P) befinden sich hauptsächlich Aktinfilamente, die in Filopodien gebündelt sind oder in Lamellipodien ein enges Netzwerk bilden (modifiziert nach Gordon-Weeks und Mansfield, 1992).

1.1 Molekulare Mechanismen der axonalen Wegfindung

Wachstumskegel werden durch vier verschiedene Mechanismen gesteuert, die als Kontakt-Attraktion, Chemoattraktion, Kontakt-Repulsion und Chemorepulsion bezeichnet werden. (Abb. 2; Dickson, 2002; Mueller, 1999; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Diese unterschiedlichen Mechanismen werden durch permissiv oder instruktiv wirkende Proteine vermittelt. Permissive Signale bilden eine geeignete Mikroumgebung für das axonale Wachstum, ohne dass dabei eine Richtung vorgegeben wird. Zu den permissiven Proteinen zählen z.B. das Neuronale Zelladhäsions-Molekül (*neuronal cell adhesion molecule*, N-CAM), N-Cadherin oder Laminin, die entweder auf der Oberfläche von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen oder in der extrazellulären Matrix lokalisiert sind (Rathjen und Jessel, 1991). Instruktive Signale vermitteln eine Richtungsinformation für die Axone. Dabei

orientieren sich die Axone an der Richtung eines Konzentrationsgradienten und nicht an der absoluten Konzentration der attraktiven oder repulsiven Signalmoleküle.

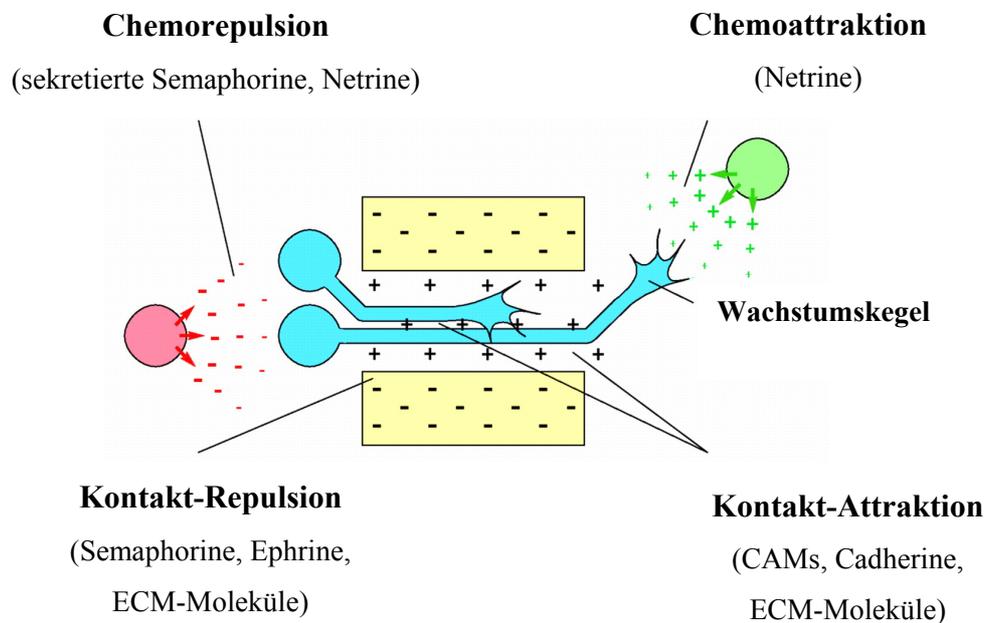


Abb. 2: Vier verschiedene Mechanismen der axonalen Wegfindung. Chemorepulsion, Kontakt-Repulsion, Chemoattraktion und Kontakt-Attraktion steuern Axone zu ihren Zielzellen. Repulsive Signale sind mit einem Minuszeichen und attraktive mit einem Pluszeichen gekennzeichnet. CAM: *Cell-adhesion molecule*; ECM: *extra-cellular matrix* (modifiziert nach Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

In den letzten Jahren wurden vier Proteinfamilien identifiziert, die wesentlich an der axonalen Wegfindung beteiligt sind: Netrine, Ephrine, Slit-Proteine und die Semaphorine. Alle vier Proteinfamilien sind evolutionär von Nematoden bis zum Mensch konserviert und haben häufig eine ähnliche Funktion während der axonalen Wegfindung. Netrine sind sekretierte Proteine, die sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken können. Die Effekte werden durch unterschiedliche Rezeptoren vermittelt. Im Fall einer Attraktion dient DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) als Rezeptor, während die Repulsion durch Unc-Proteine oder einem Komplex von Unc-Proteinen und DCC vermittelt wird (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995; Livesey, 1999). Slit-Proteine sind ebenfalls sekretierte Proteine, deren Effekte in Säugern von den Rezeptoren Robo-1 oder -2 (*Roundabout*) vermittelt werden. Auch Slit-Proteine können attraktive oder repulsive Signale vermitteln (Englund et al., 2002). Ephrine sind membrangebundene Liganden für die Eph Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und wirken repulsiv. Durch die Ligandenbindung wird der Rezeptor tetramerisiert, die

Autophosphorylierung induziert und die nachgeschaltete Signalkaskade aktiviert (Grunwald and Klein, 2002; Yu and Bargmann, 2001).

1.2 Die Semaphorine

1.2.1 Die Proteinfamilie der Semaphorine

Die Semaphorine repräsentieren die größte Proteinfamilie von Signalmolekülen, die an der axonalen Wegfindung beteiligt ist. Semaphorin 3A (Sema3A, ursprünglich als Collapsin 1 bezeichnet) war das erste chemorepulsiv wirkende Protein, das molekular charakterisiert wurde. Ursprünglich wurde es als Protein in Membranfraktionen von embryonalen oder adulten Hühnergehirnen identifiziert, das den Kollaps von sensorischen Wachstumskegeln induzierte (Kapfhammer and Raper, 1987; Luo et al., 1995; Raper and Kapfhammer, 1990). Durch die Fähigkeit den Kollaps von Wachstumskegeln zu induzieren, konnte Sema3A isoliert und die entsprechende cDNA kloniert werden. Sema3A zeigte signifikante Homologie zu Fascilin IV (später in Sema1a umbenannt), einem Protein, das in einem Screen für Glykoproteine, die von spezifischen axonalen Bahnen im zentralen Nervensystem der Heuschrecke exprimiert werden, identifiziert wurde (Kolodkin et al., 1993; Kolodkin et al., 1992). Sema3A und Sema1a waren die ersten Mitglieder einer großen Familie, die am N-Terminus eine konservierte Semaphorin-Domäne besitzen, die aus ca. 500 Aminosäuren besteht und 14 konservierte Cystein-Reste sowie eine potentielle N-Glykosylierungsstelle besitzt (Kolodkin et al., 1993; Messersmith et al., 1995; Puschel et al., 1995).

Mittlerweile sind mehr als 30 Semaphorine bekannt, die in Abhängigkeit der Sequenz der Semaphorin-Domäne und dem Vorhandensein von spezifischen carboxy-terminalen Domänen in acht Klassen eingeteilt werden (Mark et al., 1997; Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). Semaphorine der Klassen 1 und 2 sind spezifisch für Invertebraten, während sich die Klassen 3-7 in Vertebraten finden. Die Klasse 5 enthält sowohl Mitglieder von Invertebraten als auch von Vertebraten. Semaphorine der Klasse V sind virale Proteine (Adams et al., 1996; Khare et al., 2000).

Die Semaphorin-Familie enthält sowohl sekretierte (Klassen 2, 3 und V) als auch membrangebundene Proteine, die durch eine Transmembran-Domäne (Klassen 1, 4, 5 und 6) oder durch einen GPI-Anker (Klasse 7) in der Plasmamembran verankert sind. Die carboxy-terminale Domäne der meisten Semaphorine besteht aus einer Immunglobulin-ähnlichen

Domäne (Klasse 2-4 und 7), gefolgt von einem Klassen-spezifischen carboxy-terminalen Ende. Die carboxy-terminale Domäne der Klasse 5 Semaphorine enthält sieben Typ-1 Thrombospondin-Kassetten (Abb. 3).

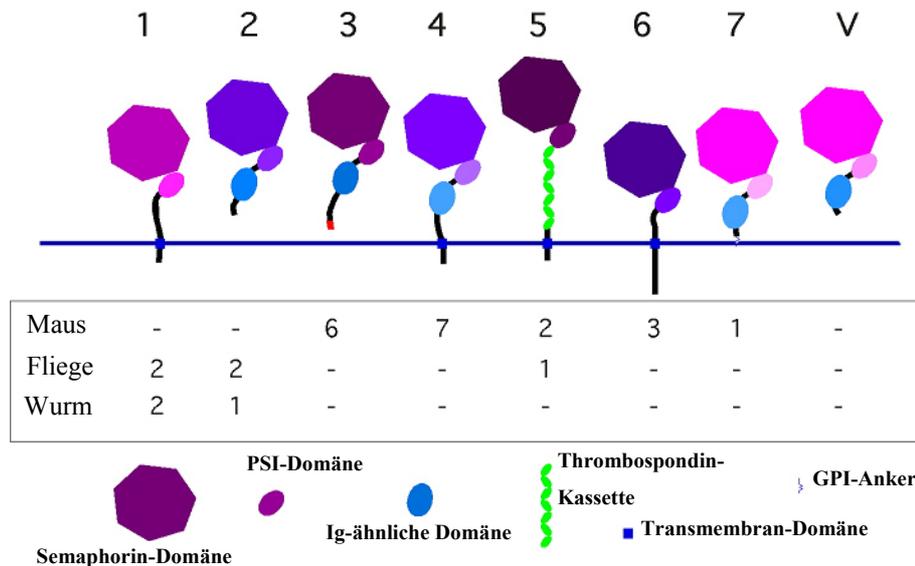


Abb. 3: Die Semaphorin-Familie. Schematische Darstellung der acht unterschiedlichen Semaphorin-Klassen: Die Klassen 1 und 2 enthalten Mitglieder der Invertebraten, die Klassen 3-7 Proteine der Vertebraten, Klasse 5 enthält sowohl Mitglieder von Invertebraten als auch von Vertebraten und Klasse V virale Proteine. Semaphorine kommen als sekretierte (Klassen 2, 3 und V) oder als membrangebundene Proteine (Klassen 1 und 4-7) vor.

Unter den Semaphorinen zählt das sekretierte Sema3A zu den am besten charakterisierten Proteinen. Durch den Kollaps-Assay (Raper and Kapfhammer, 1990), Ko-Kultur von explantierten Geweben mit Zellen, die rekombinante Proteine produzieren, und den COS Kollaps-Assay (Messersmith et al., 1995; Puschel et al., 1995; Takahashi et al., 1999) wurde eine genaue Analyse der Funktion von Sema3A und der molekularen Mechanismen der aktivierten Signalkaskade möglich (Abb. 4).

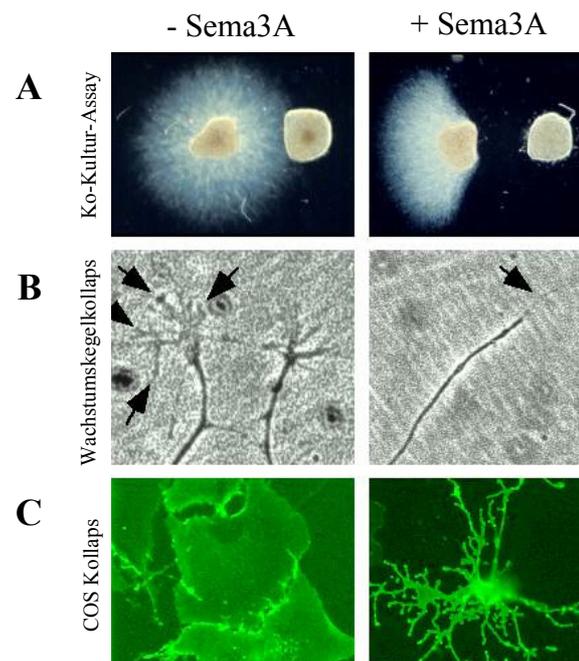


Abb. 4: *In Vitro*-Assays zur Analyse von Sema3A. (A) Im Ko-Kultur-Assay haben Sema3A exprimierende Zellaggregate einen repulsiven Effekt auf Axone sensorischer Ganglien. (B) Sema3A induziert einen Kollaps von Wachstumskegeln sensorischer Neurone. (C) Der COS Kollaps-Assay dient als Modellsystem für den Kollaps von Wachstumskegeln. Die heterologe Expression der Rezeptoruntereinheiten Nrp-1 und Plexin-A1 in COS-7 Zellen führt zur Bildung eines funktionellen Sema3A-Rezeptors. Nach Zugabe von Sema3A kollabieren die Zellen.

1.2.2 Die Funktion von Semaphorinen in der Entwicklung des Nervensystems

Fast alle Semaphorine der Vertebraten zeigen ein komplexes und dynamisches Expressionsmuster im embryonalen und adulten peripheren und zentralen Nervensystem. Bisher wurde nur die Funktion der sekretierten Klasse 3 Semaphorine genauer untersucht. Eine Kombination aus *in vitro* und *in vivo* Ansätzen zeigte, dass Semaphorine einen Einfluss auf die Wegfindung von Axonen und Dendriten, auf die axonale Faszikulierung und die neuronale Migration in Vertebraten haben. Klasse 3 Semaphorine haben *in vitro* einen starken repulsiven Effekt auf eine Vielzahl von Axonen, wie z.B. Axone sympathischer, sensorischer und motorischer Neurone (Adams et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Shepherd and Raper, 1999; Ulupinar et al., 1999; Varela-Echavarría et al., 1997), sowie auf Axone von olfaktorischen, kortikalen und hippocampalen Neuronen (Bagnard et al., 1998; Chedotal et al., 1998; de Castro et al., 1999; Kobayashi et al., 1997).

Semaphorine können aber auch attraktiv wirken. Sema3C hat einen attraktiven Effekt auf kortikale Axone (Bagnard et al., 1998) und Sema3B auf olfaktorische Axone (de Castro et al., 1999). Im Kortex hat Sema3A einen attraktiven Effekt auf Dendriten von Pyramidenzellen, während es auf ihre Axone repulsiv wirkt (Polleux et al., 2000; Polleux et al., 1998). Die intrazelluläre cGMP-Konzentration ist einer der Faktoren, die den Effekt von Sema3A auf Neurone bestimmen. Eine Erhöhung der zytosolischen cGMP-Konzentration kann den repulsiven Effekt von Sema3A in einen attraktiven konvertieren (Song et al., 1998). Eine asymmetrische Verteilung der löslichen Guanylat-Zyklase in Pyramidenzellen mit einer höheren Konzentration in Dendriten könnte eine Erklärung für den unterschiedlichen Effekt von Sema3A auf Dendriten und Axone sein (Polleux et al., 2000).

Verglichen mit den deutlichen *in vitro* Effekten zeigen Sema3A Mausmutanten nur einen schwachen Phänotyp (Catalano et al., 1998). Es wurden zwei unabhängige Mausmutanten generiert (Behar et al., 1996; Taniguchi et al., 1997), die jedoch zum Teil unterschiedlich starke Phänotypen zeigen. Die Analysen der Mutanten beschränken sich weitgehend auf embryonale und neonatale Stadien, da Sema3A^{-/-} Mäuse kurz nach der Geburt sterben. Die Letalität der Mutanten ist wahrscheinlich auf kardiovaskuläre Defekte zurückzuführen. Im zentralen Nervensystem (ZNS) der Mutanten waren allerdings keine dramatischen Effekte nachweisbar. Verschiedene periphere Axone, auf die Sema3A *in vitro* einen repulsiven Effekt hat, waren in den Mutanten stark defaszikuliert, ohne dass die Projektion der Axone zu den Zielgebieten verändert war (Taniguchi et al., 1997). Demnach scheint Sema3A *in vivo* nicht als chemorepulsives Signal auf sensorische Axone zu wirken, sondern deren Faszikulierung durch einen als Umgebungsrepulsion bezeichneten Effekt zu vermitteln (Keynes et al., 1997). Ein deutlicherer Effekt von Sema3A als Signalmolekül der axonalen Wegfindung konnte bei der Projektion von sensorischen Axonen vom olfaktorischen Epithel zum *Bulbus olfactorius* gezeigt werden. In Sema3A Mutanten zeigen Nrp-1 exprimierende sensorische Axone Projektionsdefekte und sind in ventralen Bereichen des *Bulbus olfactorius* zu finden, die normalerweise frei von diesen Axonen sind (Schwartz et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Phänotyp der Sema3A Mutanten bestätigt, dass Axone von einer Vielzahl von Signalmolekülen geleitet werden, die potentielle redundante Funktionen haben. Fehlgeleitete Axone können in der späteren Entwicklung entfernt werden, wie es für Sema3A Mausmutanten gezeigt wurde (White and Behar, 2000). Die Eliminierung eines einzelnen Signalmoleküls führt also zu einer erhöhten Fehlerrate in der Projektion von Axonen, jedoch nicht zu starken Abnormalitäten in den Strukturen des Nervensystems.

Die Funktion der membrangebundenen Semaphorine ist bisher noch weitgehend unklar. Für Sema4D und Sema6A konnte allerdings *in vitro* ein repulsiver Effekt gezeigt werden (Leighton et al., 2001; Swiercz et al., 2002).

1.2.3 Rezeptoren für Klasse 3 Semaphorine

Der repulsive Effekt von Sema3A wird durch einen Rezeptorkomplex vermittelt, der Neuropilin-1 (Nrp-1) als ligandenbindende Untereinheit und ein Typ A Plexin als signaltransduzierende Untereinheit enthält (He and Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997; Rohm et al., 2000a; Takahashi et al., 1999; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

Nrp-1 und das nah verwandte Nrp-2 binden alle getesteten Klasse 3 Semaphorine, unterscheiden sich aber in den Affinitäten für die einzelnen Mitglieder (Feiner et al., 1997; Fiore and Puschel, 2003). Die unterschiedlichen Klasse 3 Semaphorine haben spezifische Effekte auf Nrp-1 und Nrp-2 exprimierende Neurone. Sema3A wirkt repulsiv auf Nrp-1-positive Neuriten, wie sensorische oder sympathische Axone, während Sema3C oder Sema3F nur Effekte auf sympathische Neurone haben, die zusätzlich auch Nrp-2 exprimieren (Chedotal et al., 1998; Giger et al., 1998; Messersmith et al., 1995; Puschel et al., 1995). Sema3A bindet vorzugsweise Nrp-1, während Nrp-2 als Rezeptor für Sema3F und Nrp-1/Nrp-2-Heterodimere als Rezeptor für Sema3C dienen. Versuche mit blockierenden Antikörpern und „*Knock-out*“ Mäusen bestätigten, dass die Effekte von Sema3A, Sema3F und Sema3C durch diese Kombinationen von Neuropilinen vermittelt werden (Chen et al., 1997; Giger et al., 1998).

Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von Nrp-1 zeigte, dass diese für die Weiterleitung der durch Sema3A aktivierten Signalkaskade nicht erforderlich ist (Nakamura et al., 1998). Die Signaltransduktion der Klasse 3 Semaphorine wird durch Plexine vermittelt, die eine konservierte zytoplasmatische Domäne besitzen. In Säugetieren wurden neun Plexine identifiziert, die in vier Gruppen unterteilt werden (Typ A-D, Abb. 5; Cheng et al., 2001; Tamagnone et al., 1999). In Vertebraten sind Plexine vor allem im sich entwickelnden peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert, unter anderem in hippocampalen, kortikalen, sensorischen und sympathischen Neuronen (Cheng et al., 2001; Murakami et al., 2001). Im Gegensatz zu Sema4D und Sema7A, die direkt mit Plexin-B1 bzw. Plexin-C1 interagieren, benötigen alle Semaphorine der Klasse 3 mit Ausnahme von Sema3E für die Bindung des Rezeptors Neuropilin als Korezeptor (Abb. 5; Takahashi et al., 1999;

Tamagnone et al., 1999). Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 oder -A2 führt zur Bildung eines dominant negativ wirkenden Rezeptors, der den repulsiven Effekt von Sema3A in sensorischen Neuronen der Maus inhibiert (Rohm et al., 2000a; Takahashi and Strittmatter, 2001; Tamagnone et al., 1999). Die heterologe Koexpression von Nrp-1 und Plexin-A1 oder -A2 in COS-7 Zellen hingegen erlaubt die Bildung eines funktionellen Rezeptors, dessen Aktivierung durch Sema3A zum Kollaps der Zellen führt (Abb. 4C; Takahashi et al., 1999). Eine Beteiligung von Plexin-A3 an den repulsiven Effekten von Sema3F und teilweise von Sema3A konnte mit Hilfe von Plexin-A3 Mausmutanten *in vivo* gezeigt werden (Cheng et al., 2001). Durch Plexin-A3 und Plexin-A3/Plexin-A4 „*Knock-out*“ Mäuse konnte bestätigt werden, dass die Effekte von Sema3F durch Plexin-A3 und die Effekte von Sema3A durch Plexin-A4 vermittelt werden (Yaron et al., 2005).

Eine weitere Komponente des Sema3A-Rezeptorkomplexes ist das Zelladhäsionsmolekül L1CAM (Abb. 5; Castellani et al., 2000). Sensorische Axone von L1CAM „*Knock-out*“ Mäusen sind nicht sensitiv für die repulsiven Effekte von Sema3A. Eine Trans-Interaktion von L1CAM und Nrp-1 führt zur Produktion von NO und Aktivierung der Guanylat-Zyklase, die eine Umkehrung des repulsiven Effektes zum attraktiven Effekt von Sema3A in kortikalen Neuronen induziert (Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2002; Song et al., 1998). Die Koexpression von Nrp-1 und L1CAM in COS-7 Zellen führt nach Zugabe von Sema3A zum Kollaps der Zellen und ist mit einer verstärkten Endozytose verbunden (Castellani et al., 2004). L1CAM scheint demnach zumindest in COS-7 Zellen Plexin-A1 als signaltransduzierende Untereinheit ersetzen zu können.

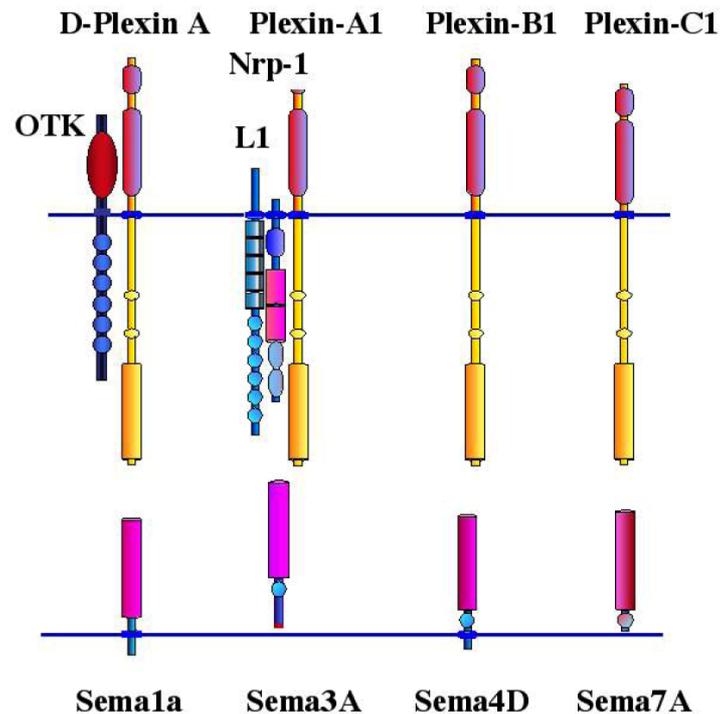


Abb. 5: Die Rezeptoren für Semaphorine. Die Semaphorin-Rezeptoren sind schematisch dargestellt. Das *Drosophila melanogaster* Semaphorin Sema1a bindet direkt an *Drosophila*-Plexin A, welches einen Komplex mit OTK (Off-track) bildet. Das sekretierte Sema3A bindet einen Rezeptorkomplex, der die ligandenbindende Untereinheit Nrp-1 und ein Typ A Plexin als signaltransduzierende Untereinheit enthält. Ein weiterer Bestandteil des Sema3A Rezeptors ist das Zell-Adhäsionsmolekül L1. Im Gegensatz zu Semaphorinen der Klasse 3 binden Sema4D und Sema7A direkt Plexin-B1 bzw. Plexin-C1.

1.2.4 Strukturelle Merkmale von Sema3A und seinem Rezeptor

Sema3A wird wie alle Semaphorine der Klasse 3 als Proprotein synthetisiert und erlangt seine vollständige Aktivität erst durch eine proteolytische Spaltung, die durch Furin oder eine verwandte Endoprotease katalysiert wird. Diese Proteasen erkennen drei konservierte Regionen, die reich an basischen Aminosäureresten sind, und schneiden das Protein carboxy-terminal dieser Sequenz. Bei der Prozessierung von Sema3A entstehen zwei Isoformen: eine 65 kDa Form mit geringer repulsiver Wirkung und eine 95 kDa Form mit hoher Aktivität (Adams et al., 1997). Sema3A bildet wie alle Semaphorine der Klasse 3 durch Disulfidbrücken kovalent verbundene Homodimere, deren Ausbildung für die repulsive Wirkung von Sema3A essentiell ist. Bei der Entstehung der 65 kDa Form von Sema3A wird durch proteolytische Spaltung am carboxy-terminalen Ende ein 33 kDa Fragment von der 95 kDa Form von Sema3A abgespalten. Diese Domäne beinhaltet die für die Dimerisierung notwendigen Cystein-Reste, so dass die kürzere Form von Sema3A in monomerer Form vorliegt (Klostermann et al., 1998). Die Prozessierung von Sema3A wird während der

embryonalen Entwicklung reguliert, und könnte neben der zellspezifischen Expression von Sema3A ebenfalls dessen Wirkung während der Entwicklung des Nervensystems bestimmen. Semaphorine bilden zusammen mit Plexinen und den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) MET und RON die Semaphorin-Superfamilie (Abb. 6; Gherardi et al., 2004). Sie besitzen alle eine Multidomänen-Struktur und sind durch ihre konservierte Semaphorin-Domäne am Amino-Terminus gekennzeichnet, die für die Funktion der Proteine essentiell ist. Fast alle Mitglieder der Semaphorin-Superfamilie besitzen eine oder mehrere Kopien einer kleinen Cysteinreichen Domäne, die carboxy-terminal nahe der Semaphorin-Domäne lokalisiert ist und als PSI-Domäne (Plexin/Semaphorin/Integrin-Domäne) oder MRS (*MET-related sequence*) bezeichnet wird. Sema3A, Plexin und die RTK MET und RON enthalten zusätzlich alle eine oder mehrere Immunglobulin-ähnliche Domänen.

Nrp-1 besitzt eine große extrazelluläre Domäne und nur eine kurze zytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne enthält 2 CUB (zu Clr/Cls, Uegf und Bmpf homologe Domäne)-Motive (Domänen A1 und A2), gefolgt von 2 Domänen mit Homologie zu den Koagulations-Faktoren V/VIII (Domänen B1 und B2) und einer MAM-Domäne (Mephrin/A5/μ-Domäne) (Domäne C). Die Subdomänen A1, A2 und B1 sind für die Bindung der Semaphorin-Domäne von Sema3A essentiell, wobei die Domäne B1 für die Bindung der carboxy-terminalen Region von Sema3A oder von VEGF165 nötig ist (Giger et al., 1998; Gu et al., 2002; Lee et al., 2003; Nakamura et al., 1998; Renzi et al., 1999).

Plexin-A1 befindet sich in Abwesenheit des Liganden in einer autoinhibierten Konformation, da die amino-terminale Semaphorin-Domäne mit der carboxy-terminalen Region (IPT-Sequenz) der Ektodomäne interagiert (Takahashi and Strittmatter, 2001). Die Bindung von Sema3A an Nrp-1 führt zur Beendigung dieser intramolekularen Inhibierung von Plexin-A1. Durch die Deletion der Ektodomäne entsteht daher eine konstitutiv aktive Form von Plexin-A1, deren Expression zur Retraktion von Neuriten führt (Takahashi and Strittmatter, 2001). Die Semaphorin-Domäne und die carboxy-terminale Region der Plexin-A1 Ektodomäne interagieren unabhängig voneinander mit Nrp-1. Die Interaktionsstelle von Nrp-1 für die Semaphorin-Domäne von Plexin-A1 überlappt nicht mit der für Sema3A. Für die Signalweiterleitung durch Plexin-A1 ist die innerhalb der Plexine konservierte zytoplasmatische Domäne essentiell (siehe 1.2.5 und 1.2.6).

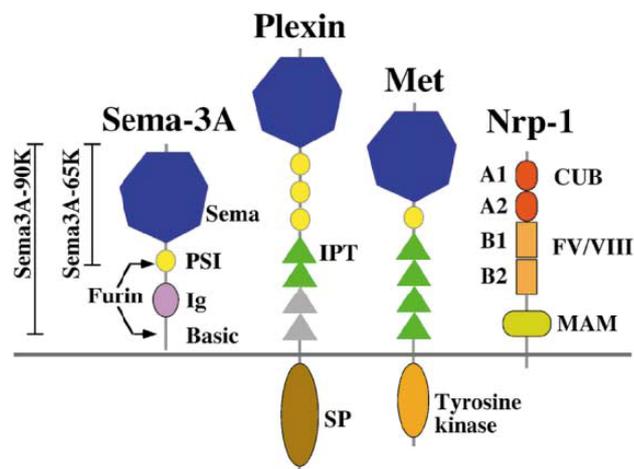


Abb. 6: Die Domänenstruktur von Sema3A, Plexin, Met und Nrp-1. Die Organisation der Domänen ist schematisch dargestellt. Sema: Semaphorin-Domäne; PSI: Plexin/Semaphorin/Integrin-Domäne; Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne; Basic: basische carboxy-terminale Region; Sema3A-90K: 90 kDa Form von Sema3A, das durch proteolytische Spaltung durch die Endoprotease Furin entsteht; Sema3A-65K: 65 kDa Form von Sema3A, das durch proteolytische Spaltung der 90 kDa Form entsteht. IPT: Immunglobulin-ähnliche Domäne in Plexinen (und Met) und in Transkriptionsfaktoren; SP: Sex-Plexin-Domäne mit Homologie zu R-RasGAPs; CUB: zu den Komplement-Bindefaktoren Clr und Cls homologe Domäne (A1 und A2); FV/VIII: zu den Koagulations-Faktoren V/VIII homologe Domäne (B1 und B2); MAM: Mephrin/A5/μ-Domäne (modifiziert nach Antipenko et al., 2003).

1.2.5 Signaltransduktions-Kaskade des Sema3A-Rezeptors

Das Verhalten von Wachstumskegeln wird durch die Dynamik des Zytoskeletts bestimmt. Die Inkubation von sensorischen Neuronen mit Sema3A führt innerhalb von 10 – 20 Minuten zum Kollaps der Wachstumskegel, der durch die Depolymerisierung von Aktinfilamenten und Verlust der Substrat-Adhäsion verursacht wird. Es wurden verschiedene Proteine identifiziert, die direkt oder indirekt mit der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 interagieren und für die Signalweiterleitung erforderlich sind (Abb. 7).

Plexin-A1 und Plexin-A2 interagieren mit Fyn und über Fyn indirekt mit Cdk5 (*cyclin-dependent kinase*). Sema3A induziert die Phosphorylierung und Aktivierung von Cdk5 durch Fyn, welche für den Kollaps von Wachstumskegeln essentiell ist. Eine Rolle für Fyn in der Funktion von Sema3A konnte ebenfalls mit genetischen Methoden gezeigt werden. Sema3A hat einen attraktiven Effekt auf Dendriten von Pyramidenzellen, während es auf die Axone repulsiv wirkt (Polleux et al., 2000). Doppelt heterozygote Sema3A^{+/-}/Fyn^{+/-} und Sema3A^{+/-}/Cdk5^{+/-} Mäuse zeigen Defekte in der Orientierung von kortikalen Dendriten (Sasaki et al., 2002).

Auch die Tyrosinkinase Fes interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 und ist für den Effekt von Sema3A notwendig (Mitsui et al., 2002). Die Interaktion von Nrp-1 und Plexin-A1 verhindert die Bindung von Fes durch Plexin-A1 in Abwesenheit des Liganden. Nach Bindung von Sema3A an den Rezeptor rekrutiert Plexin-A1 Fes an die Zellmembran und stimuliert dessen Kinaseaktivität. Aktives Fes phosphoryliert Plexin-A1 und andere Komponenten der Signalkaskade, wie CRMP-2/CRAM (*Collapsin Response Mediator Protein/CRMP-associated molecule*) -Heterotetramere, die einen Komplex mit Fes bilden (Inatome et al., 2000; Mitsui et al., 2002). Die Phosphorylierung von Plexin-A1 und/oder CRMPs ist essentiell für die Signaltransduktion, und die Expression einer Kinase-defizienten Fes-Mutante inhibiert den Kollaps von Wachstumskegeln.

CRMP-2 wurde ursprünglich als eine Komponente des Sema3A induzierten Signalwegs identifiziert, da die Neutralisation von CRMP-2 den durch Sema3A induzierten Kollaps von Wachstumskegeln blockiert (Goshima et al., 1995). Cdk5 phosphoryliert Serin-522 in CRMP-2, worauf eine weitere Phosphorylierung von Threonin-509 durch GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) folgt (Uchida et al., 2005). Sema3A stimuliert diese Phosphorylierung von CRMP-2 in sensorischen Neuronen und die Expression einer nicht phosphorylierbaren CRMP-2 Mutante vermindert den von Sema3A induzierten Kollaps der Wachstumskegel (Uchida et al., 2005). Sema3A induziert ebenfalls die Dephosphorylierung und damit die Aktivierung von GSK3 β , welche für die Retraktion der Wachstumskegel notwendig ist (Eickholt et al., 2002).

Ein weiteres Protein, welches Bestandteil der von Sema3A aktivierten Signalkaskade ist und einen direkten Einfluss auf das Zytoskelett hat, ist die LIM-Kinase I. Diese phosphoryliert und inhibiert das Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin. Sema3A induziert zunächst die Phosphorylierung von Cofilin in Wachstumskegeln, worauf rasch eine Dephosphorylierung folgt. Die Inhibition der LIM-Kinase I, oder die Expression einer LIM-Kinase Mutante, die nicht mehr durch PAK oder ROCK aktiviert werden kann, inhibiert den durch Sema3A induzierten Kollaps (Aizawa et al., 2001). Daher scheint die Phosphorylierung von Cofilin durch die LIM-Kinase I für den durch Sema3A induzierten Kollaps der Wachstumskegel essentiell zu sein.

Die 12/15-Lipoxygenase (LOX) scheint Bestandteil eines zur LIM-Kinase parallelen Signalwegs zu sein, da deren Inhibition die Depolymerisierung von Aktinfilamenten nicht beeinflusst, aber den Kollaps von Wachstumskegeln verhindert. Der größte Anteil freier Arachidonsäure wird in Wachstumskegeln in Phospholipide eingebaut, aus einem kleineren Anteil wird jedoch durch die LOX 12-S- und 15(S)-HETE (Hydroxyeicosatetraensäure)

gebildet (Dailey and Imming, 1999; Yamamoto et al., 1999). Die Behandlung sensorischer Neurone mit Sema3A erhöht die Synthese des Eicosanoids 12(S)-HETE, während die Inhibition der LOX den Kollaps blockiert. Die Behandlung der Zellen mit 12(S)-HETE ist ausreichend, um einen Kollaps zu induzieren, wobei es zum Verlust der Zelladhäsion kommt, die Aktinfilamente jedoch nicht depolymerisieren. Bei der gleichzeitigen Inkubation mit Sema3A und einem LOX-Inhibitor depolymerisieren die Aktinfilamente, die Zelladhäsion wird jedoch nicht reduziert (Mikule et al., 2002).

In einem „*Yeast Two-Hybrid*“ Screen wurde mit der zytoplasmatischen Domäne von *Drosophila* Plexin-A das Protein MICAL als Interaktionspartner identifiziert (Terman et al., 2002). Am Amino-Terminus besitzen *Drosophila* MICAL und die drei Vertebraten-Homologe MICAL-1 bis -3 eine Flavoprotein-Monooxygenase-Domäne und binden FAD. Eine Mutation von MICAL führt zu ähnlichen Defekten axonaler Projektionen wie in PlexA- oder Sema-1a Mutanten. Das FAD-Bindemotiv ist für die Funktion von MICAL essentiell. Humanes MICAL-1 interagiert mit Plexin-A3 und -A4 und Flavoprotein-Monooxygenase Inhibitor neutralisieren *in vitro* den repulsiven Effekt von Sema3A auf sensorische Neurone. MICAL-Proteine sind also weitere wichtige Komponenten für die Vermittlung der repulsiven Effekte verschiedener Semaphorine, wobei die potentielle Monooxygenase Aktivität von MICAL für diese Funktion notwendig zu sein scheint. Da die verwendeten Inhibitoren jedoch nicht spezifisch für Flavoprotein-Monooxygenasen sind, bleibt es zu zeigen, dass MICAL-Proteine ihre Funktion durch diese Enzymaktivität ausüben.

Zusätzlich zu den diskutierten Proteinen spielen auch monomere GTPasen, die im Folgenden näher beschrieben werden, eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der Effekte von Semaphorinen.

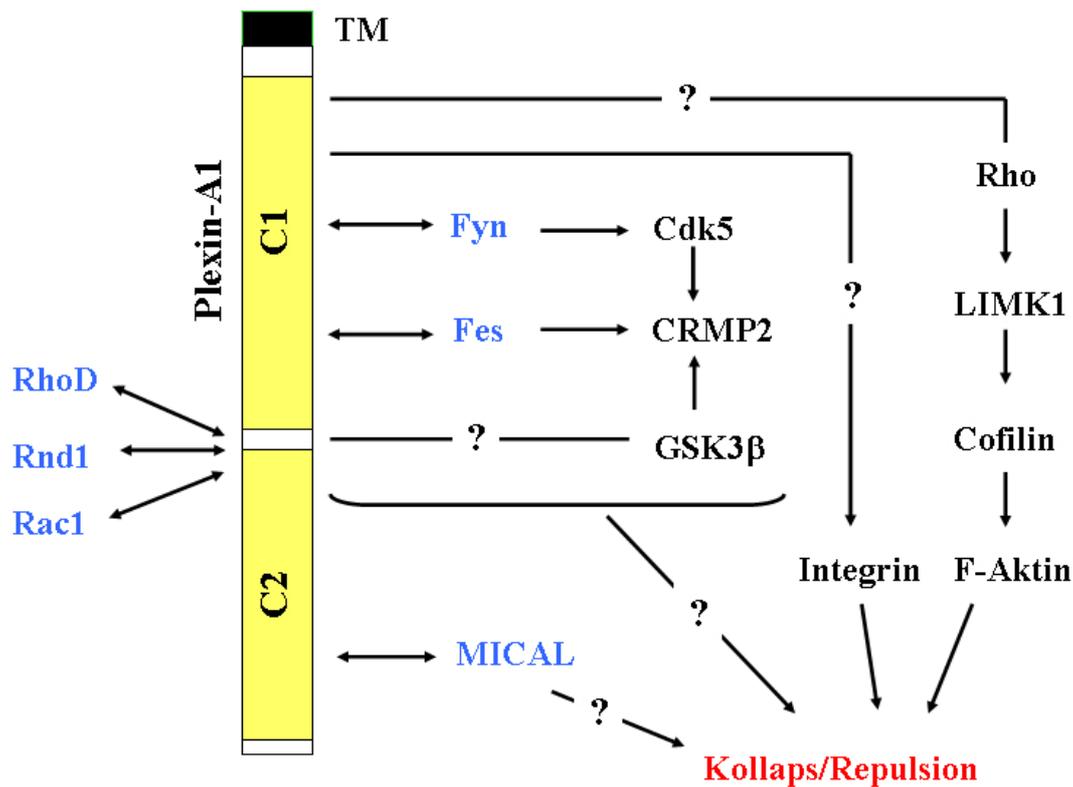


Abb. 7: Die von Typ A Plexinen aktivierte Signalkaskade. Die im Text genauer beschriebene Signalkaskade ist schematisch dargestellt. TM: Transmembran-Domäne. Bekannte Interaktionspartner der zyttoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 sind blau markiert. Bisher unbekannte Komponenten des Signalweges sind als Fragezeichen dargestellt.

1.2.6 Die Rolle von GTPasen im Plexin-vermittelten Signalweg

Die zyttoplasmatische Domäne von Plexin-A1 enthält zwei konservierte Subdomänen (C1 und C2), die durch eine variable Region voneinander getrennt sind und Sequenzhomologie zu RasGAPs zeigen (Abb. 8). Die Sequenz der Domänen C1 und C2 der zyttoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 ist 30% bzw. 48% identisch zu SynGAP bzw. einem R-RasGAP. Zusätzlich enthalten sie zwei konservierte Arginin-Reste (R1430 und R1746), die den für die katalytische Aktivität notwendigen Resten von RasGAPs entsprechen. Durch Mutation dieser Arginin-Reste zu Alanin verliert Plexin-A1 seine Fähigkeit den Kollaps von COS-7 Zellen durch Sema3A zu vermitteln (Rohm et al., 2000b). Dies war der erste experimentelle Hinweis darauf, dass Plexine GAP-Aktivität besitzen könnten und so die Aktivität von GTPasen direkt regulieren. Die zyttoplasmatische Domäne von Plexin scheint im inaktiven Zustand in einer autoinhibierten Konformation vorzuliegen. Es konnte sowohl für Plexin-A1 als auch für

Plexin-B1 gezeigt werden, dass die C1- und die C2-Domänen miteinander interagieren und diese Interaktion nach Aktivierung von Plexin-A1 bzw. Plexin-B1 beendet wird (Oinuma et al., 2004b; Turner et al., 2004). Neben einer potentiellen GAP-Aktivität für GTPasen konnte eine direkte Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 mit den GTPasen Rnd1, RhoD und Rac1 gezeigt werden (Rohm et al., 2000b; Turner et al., 2004; Zanata et al., 2002). Die zytoplasmatische Domäne von Plexin-B1 interagiert ebenfalls mit Rac1 und Rnd1 (Oinuma et al., 2004a; Vikis et al., 2000). Die Interaktionsstelle für die GTPasen liegt bei beiden Plexinen zwischen den C1 und C2 Domänen. Die Mutation der drei Aminosäuren LVP1598,1599,1600GGA in Plexin-A1 verhindert die Interaktion mit Rnd1 und RhoD (Zanata et al., 2002). Die äquivalente Mutation in Plexin-B1 verhindert die Interaktion mit Rac1 und Rnd1 (Vikis et al., 2000). Die GTPasen sowie ihre bisher bekannten Funktionen im Plexin aktivierten Signalweg sind im Folgenden näher beschrieben.

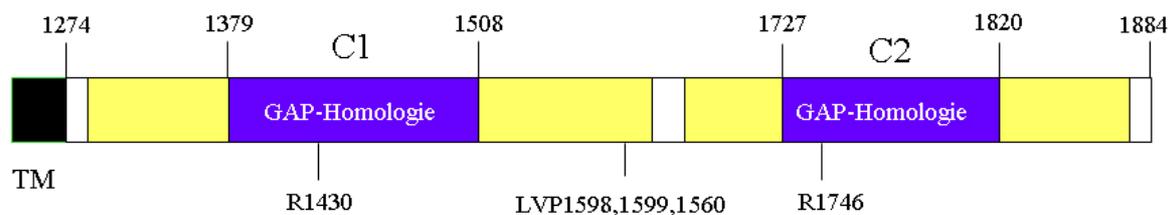


Abb. 8: Die zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1. Eine zu RasGAPs homologe Region (violett) innerhalb der konservierten Subdomänen C1 und C2 (gelb) wird durch eine variable Region getrennt. Zwei Arginin-Reste (R1430 und 1746) innerhalb der GAP-homologen Regionen entsprechen den für die katalytische Aktivität notwendigen Resten der Ras-GAPs. Die Aminosäuren Lysin 1598, Valin 1599 und Prolin 1600 sind für die Interaktion von Plexin-A1 mit Rnd1 und RhoD essentiell. TM: Transmembran-Domäne.

Die monomeren GTPasen der Ras-Superfamilie besitzen eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle, wie z.B. die Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Govek et al., 2005; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Zu den GTPasen der Ras-Superfamilie zählen die Rho GTPasen (*Ras homologous*), deren 20 Mitglieder in Säugern in 5 Gruppen unterteilt werden: die Rho, Rnd, Cdc42, Rac und RhoBTB GTPasen. Die GTPasen RhoD, Rif und RhoH/TTF fallen aufgrund ihrer Sequenzen in keine dieser Gruppen (Abb. 9). Rho GTPasen sind zentrale Regulatoren des Zytoskeletts und der Organisation von Aktinfilamenten (Hall, 1998). Die GTPasen Cdc42, Rho und Rac sind hinsichtlich ihrer Funktion in Fibroblasten sehr gut charakterisiert worden. Die Injektion von aktivem Cdc42 in Fibroblasten induziert die Bildung von Filopodien (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995). Aktives Rac

induziert Lamellipodien und „membrane ruffels“ (Ridley et al., 1992), wohingegen es durch aktives Rho zur Ausbildung von Stressfasern und fokalen Zelladhäsions-Komplexen kommt (Ridley and Hall, 1992). In Neuronen stimuliert die Aktivierung von Rac und Cdc42 das Neuritenwachstum, während die Aktivierung von Rho die Retraktion von Neuriten induziert (Luo, 2000). Die GTPasen Rnd1, Rnd2 und Rnd3 (RhoE) bilden eine besondere Gruppe der Rho GTPasen, da sie eine geringe Affinität für GDP und intrinsische GTPase-Aktivität besitzen. Wie die Aktivität der Rnd GTPasen reguliert wird ist bisher unklar (Foster et al., 1996; Guasch et al., 1998; Nobes et al., 1998). Von den Rnd GTPasen sind besonders Rnd1 und Rnd2 stark im Nervensystem exprimiert (Nishi et al., 1999; Nobes et al., 1998). Die transiente Expression von Rnd1 oder Rnd3 führt zum Verlust von Stressfasern, Retraktion und Abrunden des Zellkörpers und zur verstärkten Verzweigung von Neuriten (Nobes et al., 1998), wobei die morphologischen Effekte von Rnd1 und Rnd3 zum Teil durch das mit den Rnd GTPasen interagierende Protein Socius vermittelt werden (Katoh et al., 2002).

Die GTPase RhoD scheint bei der Endozytose eine wichtige Rolle zu spielen. RhoD interagiert mit humanem Diaphanous2C (hDia2C; Gasman et al., 2003). RhoD bindet und aktiviert hDia2C, wodurch dieses an frühe Endosomen rekrutiert wird, die für die Endozytose eine wichtige Rolle spielen. Die Aktivierung von hDia2C durch RhoD bewirkt eine Verlangsamung der Endosomen. Dabei scheinen Interaktionen der Endosomen mit Aktinfilamenten stabilisiert zu werden. Humanes Dia2C gehört zu den Drf-Proteinen (*Diaphanous-related Formins*). Drf-Proteine sind Effektoren von Rho-GTPasen mit einer amino-terminalen GTPase-Bindedomäne, einer carboxy-terminalen autoregulatorischen Domäne und zwei Formin homologen Domänen. Die GTPase-Bindedomäne interagiert in Abwesenheit der GTPase mit der carboxy-terminalen Domäne, wodurch eine autoinhibierte Konformation des Proteins induziert wird, die nach Bindung der GTPase aufgehoben wird.

Rho-GTPasen wechseln wie alle GTPasen der Ras-Superfamilie zwischen einem aktiven, GTP-gebundenem und einem inaktiven, GDP-gebundenem Zustand (Abb. 10). Reguliert werden sie durch Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs), die den Austausch von GDP durch GTP stimulieren und damit die GTPasen aktivieren (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Weitere Regulatoren sind GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die die sehr langsame intrinsische GTP-Hydrolyse der GTPasen um das 10^5 -fache beschleunigen (Wittinghofer et al., 1997). Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) inhibieren den Austausch von GDP durch GTP und somit die Aktivierung der GTPasen.

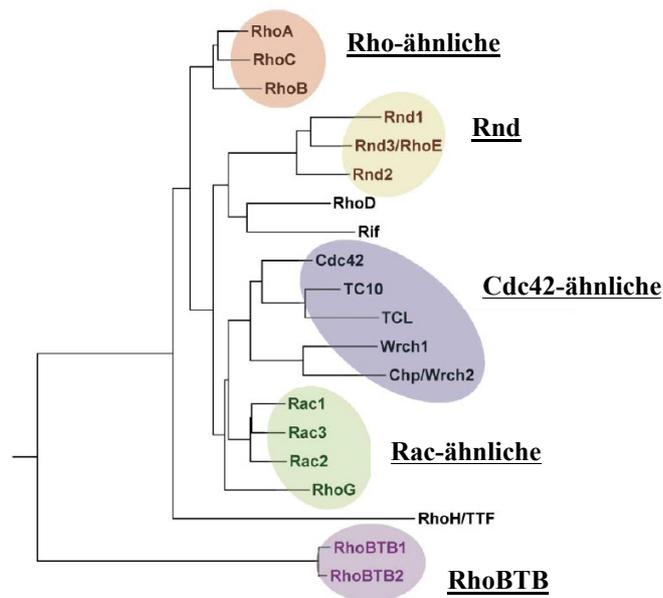


Abb. 9: Die Protein-Familie der Rho GTPasen. Es sind 20 Mitglieder bekannt, die in 5 Gruppen unterteilt werden. Die GTPasen RhoD, Rif und RhoH/TIF fallen in keine dieser Gruppen (modifiziert nach Burridge und Wennerberg, 2004).

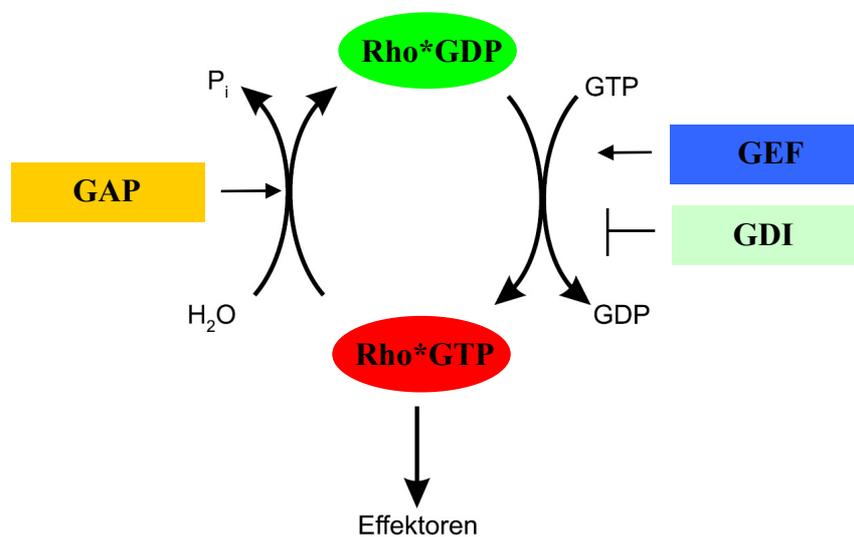


Abb. 10: Regulation von Rho-GTPasen. Rho-GTPasen wechseln wie alle GTPasen der Ras-Superfamilie zwischen einem GDP-gebundenem, inaktiven und einem GTP-gebundenem, aktiven Zustand. Dabei werden sie durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) reguliert.

Für verschiedene Rho-GTPasen wurde eine Beteiligung am durch Sema3A oder Sema4D ausgelösten Signalweg beschrieben. Dominant negatives RacN17 inhibiert den durch Sema3A induzierten Kollaps von Wachstumskegeln (Jin and Strittmatter, 1997; Journey et al., 2002; Kuhn et al., 1999; Vastrik et al., 1999). Die Inkubation von Neuronen mit Sema3A führt zu einer Stimulierung der Endozytose in Wachstumskegeln, wodurch Komponenten des Sema3A-Rezeptors vermehrt endozytiert werden (Fournier et al., 2000). Rac1 scheint dabei für die Liganden-induzierte Endozytose essentiell zu sein, jedoch nicht für die Depolymerisierung von F-Aktin. Rac1 interagiert direkt mit der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 und hebt dadurch die intramolekulare Interaktion der amino-terminalen C1 und carboxy-terminalen C2 Domäne von Plexin-A1 auf, was vermutlich zur Aktivierung von Plexin-A1 führt (Turner et al., 2004). In Nrp-1 und Plexin-A1 exprimierenden COS-7 Zellen kommt es nach Inkubation mit Sema3A zur Aktivierung von Rac1, die der Aktivierung des Rezeptors vorgeschaltet zu sein scheint.

Die Interaktion von Rnd1 mit der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 aktiviert Plexin-A1 und induziert den Kollaps von COS-7 Zellen, unabhängig von der Anwesenheit des Liganden (Rohm et al., 2000b; Zanata et al., 2002). Durch eine Mutation der LVP-Sequenz verliert Plexin-A1 die Fähigkeit mit Rnd1 zu interagieren und einen Zellkollaps auszulösen. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen Rnd1 und Plexin-A1 ebenfalls für die Weiterleitung der Sema3A-induzierten Signalkaskade notwendig ist.

Eine weitere GTPase, die mit der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 interagiert, ist RhoD (Zanata et al., 2002). In COS-7 Zellen zeigt RhoD einen zu Rnd1 antagonistischen Effekt. Während die Koexpression von Rnd1 und Plexin-A1 einen Zellkollaps induziert, inhibiert die Expression von RhoD den durch Sema3A oder Rnd1 induzierten Kollaps von COS-7 Zellen und die Repulsion sympathischer Neurone durch Sema3A (Zanata et al., 2002). Die Funktion von RhoD im Plexin-A1 vermittelten Signalweg ist jedoch bisher noch wenig verstanden. Möglicherweise spielt die Regulation der Endozytose durch RhoD eine Rolle.

Die zytoplasmatische Domäne von Plexin-B1 interagiert ebenfalls mit den GTPasen Rac1 und Rnd1 (Oinuma et al., 2003; Vikis et al., 2000). Durch die Aktivierung des Rezeptors wird die Interaktion von aktivem Rac1 mit Plexin-B1 verstärkt, wodurch es zur Reduktion der Rac1-abhängigen Aktivierung von PAK (*p21-activated kinase*) kommen könnte. Die Interaktion zwischen Rac1 und Plexin-B1 scheint bidirektional zu sein, da die GTPase die Bindung von Sema4D an den Rezeptor verstärkt und die Lokalisation von Plexin-B1 an die Zelloberfläche stimuliert (Vikis et al., 2002).

Die Interaktion zwischen Rnd1 und der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-B1 ist für den von Sema4D induzierten Zellkollaps essentiell (Oinuma et al., 2003). Rnd1 hebt die intramolekulare Interaktion der amino-terminalen und der carboxy-terminalen Region der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-B1 auf, ähnlich wie es für Rac1 und Plexin-A1 gezeigt ist (Oinuma et al., 2004b). Desweiteren potenziert die Interaktion zwischen Rnd1 und Plexin-B1 die Aktivierung von RhoA, indem Rnd1 die Interaktion von Plexin-B1 und dem Nukleotid austauschfaktor PDZ-RhoGEF verstärkt (Oinuma et al., 2003; Perrot et al., 2002; Swiercz et al., 2002). In COS-7 Zellen führt die Koexpression von Rnd1 und Plexin-B1 in Anwesenheit des Liganden zum Kollaps der Zellen und Rnd1-gebundenes Plexin-B1 bildet einen Komplex mit R-Ras (Oinuma et al., 2004a). Durch eine Plexin-B1 Mutante, die nicht mit Rnd1 interagiert, wird diese Komplexbildung verhindert. Ebenfalls sind die konservierten Arginin-Reste der GAP homologen Domänen für die Interaktion mit R-Ras essentiell. Nach Aktivierung von Plexin-B1 durch Sema4D zeigt Rnd1-gebundenes Plexin-B1 eine für R-Ras spezifische GAP-Aktivität und inaktiviert R-Ras (Oinuma et al., 2004a). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass Plexine GAP-Aktivität besitzen. R-Ras spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion durch Aktivierung von Integrinen, fördert Zellmigration und das Auswachsen von Neuriten (Ivins et al., 2000; Keely et al., 1999; Zhang et al., 1996). Durch die Inaktivierung von R-Ras durch Plexin-B1 könnten diese Effekte inhibiert werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Effekte von Sema3A werden durch einen Rezeptorkomplex vermittelt, der Nrp-1 als ligandenbindende Untereinheit und ein Typ A Plexin als signaltransduzierende Untereinheit enthält. Die Verwendung von Neuropilin als Korezeptor ist eine Besonderheit der meisten Klasse 3 Semaphorine. Während z.B. Sema4D direkt mit Plexin-B1 interagiert, konnte für Sema3A bisher keine Interaktion mit Plexin gezeigt werden. Nach Aktivierung von Sema3A wird die intramolekulare Interaktion und Autoinhibition der extrazellulären Domäne von Plexin-A1 beendet, wodurch die zytoplasmatische Domäne wahrscheinlich eine aktive Konformation annimmt. Die Aktivierung von Plexin-A1 führt zur Repulsion von Axonen oder zum Kollaps von Wachstumskegeln, wobei die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 mit GTPasen eine wesentliche Rolle spielt. RhoD interagiert mit Plexin-A1 und inhibiert die repulsiven Effekte von Sema3A. Es ist jedoch nicht bekannt, welche Funktion diese Interaktion hat und ob RhoD oder andere GTPasen durch Plexin-A1 reguliert werden.

Es stellte sich daher zunächst die Frage, wie die Bindung von Sema3A zu einer Aktivierung des Rezeptors führt. Die Analyse der Struktur der Semaphorin-Domäne kann Aufschluss über die Interaktion mit dem Rezeptor geben. Auf Basis der Kristallstruktur der Semaphorin-Domäne von Sema3A, welche für die Bindung und Aktivierung des Rezeptors essentiell ist, sollten daher die für die Interaktion mit dem Sema3A-Rezeptor wichtigen Sequenzen von Sema3A charakterisiert werden. Desweiteren ergab sich die Frage, wie die Aktivierung des Rezeptors auf GTPasen wirkt. Die funktionelle Analyse von RhoD und dessen Effektormolekülen sollte Aufschluss über die durch Sema3A aktivierte Signalkaskade geben. Desweiteren sollte durch biochemische Ansätze untersucht werden, ob die Aktivitäten anderer GTPasen durch eine potentielle GAP-Aktivität von Plexin-A1 reguliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Axiophot	Zeiss, Oberkochen
BioDocAnalyze für Agarose Gele	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	Amersham Biosciences, Freiburg
French Pressure Cell Press	Thermo Spectronic, USA
Image Reader LAS-100	Fujifilm, Straubenhardt
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Sequenziergerät	Megabace, Amersham Biosciences, Freiburg
Stopped-Flow-Gerät	Applied Photophysics, GB
Sterile Werkbank	Kendro, Hanau
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Ultraschallgerät	B. Braun Biotech International, Melsungen

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Appllichem, Gibco-BRL, Merck, Sigma-Aldrich, Roche Diagnostics und Roth bezogen. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidest.) angesetzt.

2.1.3 Medien, Nährböden und Lösungen für Bakterienkulturen

Zur Sterilisierung wurden die Medien 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

LB-Flüssigmedium (Luria Bertani-)	Bacto-Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
		pH 7,5

LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Bacto-Agar	15 g/l
	pH 7,5	
Antibiotika	100 µg/ml Ampicillin	
	50 µg/ml Kanamycin	

2.1.4 Lösungen für molekularbiologische Methoden

Alkalische Lyse

Lösung A	50 mM Glukose
	25 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA, pH 8,0
	10 µg/ml RNase
Lösung B	1% SDS
	0,2 M NaOH
Lösung C	3 M Kaliumacetat
	2 M Eisessig

DNA-Gelelektrophorese

10X TBE	50 mM Tris
	890 mM Borsäure
	10 mM EDTA, pH 8,0

6X DNA-Ladepuffer	50% Glyzin 15 mM EDTA 0,15% Bromphenolblau 0,15% Xylencyanol
Ethidiumbromid-Lösung	10 µg/ml

Isolierung von RNA

DEPC-Wasser	1% Diethylpyrocarbonat
-------------	------------------------

2.1.5 Material für molekularbiologische Methoden

RNase	Roche Diagnostics, Mannheim
Plasmid-Isolations-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt
<i>Advantage</i> Taq 2-Polymerase	Clontech, Heidelberg
1 kb-Marker (<i>Smart Ladder</i>)	Eurogentec, Köln
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Polynukleotidkinase	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs (PCR grade)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Elektroporationsküvetten	Eurogentec, Köln
Sequenzier-Kit (<i>Labelling Kit für Megabace</i>)	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>peqGOLD RNA PURE</i> zur RNA-Isolierung	Peqlab, Erlangen
Reverse Transkriptase	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Quik Change® II</i>	Stratagene, USA
<i>Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	

2.1.6 Lösungen für biochemische Methoden

Herstellung von Proteinlysaten

1X PBS	NaCl 8 g/l KCl 0,2 g/l Na ₂ HPO ₄ 1,44 g/l KH ₂ PO ₄ 0,24 g/l pH 7,4
TLB-Puffer (Pulldown-Assay)	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM DTT 1,5 mM MgCl ₂ 4 mM EDTA 10% Glycerol 1% Triton X-100 1 Tablette <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) pro 50 ml Puffer
IP-Lysepuffer (Immunpräzipitation)	2% Triton X-100 in PBS
Aufschluss von Bakterienkulturen	
Bakterien-Lysepuffer	1X PBS 2 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 1 Tablette <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) pro 50 ml Puffer 10% Glycerol

Pulldown-Assay

1X Bindepuffer	25 mM NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1 mM DTT
PD-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM DTT 1,5 mM MgCl ₂ 5 mM EDTA 10% Glycerol 0,1% Triton X-100

SDS-PAGE

Trenngel	7,5%, 10% oder 12,5% Acrylamid 0,375 M Tris pH 8,8 0,1% SDS 4 µl/ml 10% Ammoniumpersulfat 0,72 µl/ml TEMED
Sammelgel	4% Acrylamid 0,1% SDS 6 µl/ml 10% Ammoniumpersulfat 0,72 µl/ml TEMED
5X Probenpuffer	15% SDS 50% Glycerol 15% β-Mercaptoethanol 1,5% Bromphenolblau

10X SDS Laufpuffer	25 mM Tris 250mM Glyzin 0,1% SDS
--------------------	--

Coomassie-Färbung

Coomassie-Blau-Lösung	0,25% Coomassie-Blau R250 10% Essigsäure 50% Methanol
-----------------------	---

Entfärbelösung	10% Isopropanol 10% Essigsäure
----------------	-----------------------------------

Western-Blot

Blot-Puffer	2,5 mM Tris pH 25 mM 0,01% SDS 20% Methanol
-------------	--

Immundetektion

Blockpuffer I	3% BSA 1X PBS
---------------	------------------

Blockpuffer II	10% Magermilchpulver 3% Tween 1X PBS
----------------	--

“Stripping”-Puffer für PVDF-Membranen	100 mM β -Mercaptoethanol 50 mM Tris-HCl pH 7,5 2% SDS
---------------------------------------	--

2.1.7 Material für biochemische Methoden

Glutathion-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
GTP γ S	Sigma, Taufkirchen
PVDF-Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>High Molecular Weight Marker</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>Prestained Marker</i>	MBI-Fermentas, St. Leon Rot
ECL-System	Interchim, Mannheim

2.1.8 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Trypsin/EDTA	2,5% Trypsin/EDTA
Medium für HEK 293T Zellen: MEM + 10%FCS	Minimum Essential Medium 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS)
Medium für COS-7 Zellen: DMEM + 10% FCS	Dulbecco´s Modified Eagles Medium 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS)
Medium für Shep-SF Zellen: RPMI + 10% FCS	RPMI 1640 Medium 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS)

COS-7 Kollaps-Assay mit Sema3A-65K

Resuspensionspuffer
6,7 mM HEPES
330 mM KCl
pH 7,5

Transfektion

2X BBS
50 mM N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES)
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄
pH 6,95

Indirekte Immunfluoreszenz

Blockpuffer
3% BSA
1X PBS

AP-Assay /**Quantitativer Nrp-1 Bindungs-Assay**

AP-Substratlösung
100 mg (1 Kapsel) *Sigma 104 Phosphatase*
Substrat in 50 ml AP-Puffer

AP-Puffer
100 mM Tris pH
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
pH 9,5

Nrp-1 Bindungs-Assay

AP-Färbelösung	34 µg/ml Nitro-blau-tetrazolium (NBT) 18 µg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyphosphat (BCIP) 1X AP-Puffer
----------------	--

Reinigung von Membranfraktionen

Lysepuffer	20 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 250 mM Sucrose 0,1 mM DTT 1 Tablette <i>complete protease inhibitor</i> (EDTA-frei) pro 10 ml Puffer
------------	--

Resuspensionspuffer	20 mM Tris pH 8,0 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 0,5 mg/ml BSA 1 Tablette <i>complete protease inhibitor</i> (EDTA-frei) pro 10 ml Puffer
---------------------	---

Stopped Flow-Messung

Messpuffer	30 mM Tris pH 7,5 2 mM MgCl ₂ 3 mM DTT
------------	---

2.1.9 Material für die Zellkultur

<i>FuGene6</i> Transfektions-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	DakoCytomation, Hamburg
<i>Amicon Ultra</i> -Zentrifugationsfilter	Millipore, Schwalbach

2.1.10 Bakterienstämme

XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [<i>F'proABlacIqZM15, TN10 (tet^R)</i>], Stratagene, Heidelberg
M15	Plasmid tragend: pREP4 (Km ^r) <i>nal^s str^s rif^r lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ recA⁺ uvr⁻</i> , Qiagen, Hilden

2.1.11 Zelllinien

HEK 293T Zellen	Humane Nierenfibroblasten mit einer stabilen Integration des large T-Antigens des SV-40 Virus
COS-7 Zellen	Nierenfibroblasten aus der Grünen Meerkatze
Shep-SF Zellen	Humane Neuroblastom-Zelllinie (Ross et al., 1983) Diese Zelllinie wurde freundlicherweise vom Institut für Neuropathologie, Universität Münster zur Verfügung gestellt.
HEK293-717	mit dem Plasmid Nr.717 (AP-Sema3A) stabil transfizierte Zelllinie (Rohm et al., 2000)

2.1.12 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Labornummer	Referenz
pBK-CMV	Kana ^r	284	Stratagene
pBK-HA-Nrp-1	Kana ^r	817	Rohm et al., 2000
pBK-VSV-Plexin-A1	Kana ^r	881	Rohm et al., 2000
pBK-CMV-AP-Sema3A	Kana ^r	717	Rohm et al., 2000
pAcGP67B-Sema3A-65K	Amp ^r	1743	Antipenko et al., 2003
pAcGP67B-Sema3A-65K Δ 1	Amp ^r	1744	Antipenko et al., 2003
pAcGP67B-Sema3A-65K Δ 2	Amp ^r	1745	Antipenko et al., 2003
pBK-CMV-AP-Sema3A Δ 3	Kana ^r	1746	diese Arbeit
pBK-CMV-AP-Sema3A-P1	Kana ^r	1747	diese Arbeit
pBK-CMV-GFP-RhoD	Kana ^r	1209	Zanata et al., 2002
pBK-CMV-GFP-RhoDV26	Kana ^r	1223	Zanata et al., 2002
pBK-CMV-GFP-RhoDY46F	Kana ^r	1287	Rohm et al., unpubliziert
pBK-CMV-GFP-RhoDT49S	Kana ^r	1288	Rohm et al., unpubliziert
pBK-CMV-GFP-RhoDF51G	Kana ^r	1289	Rohm et al., unpubliziert
pBK-CMV-GFP-RhoDY54G	Kana ^r	1290	Rohm et al., unpubliziert
pGEX-4T-2	Amp ^r	743	Amersham Biosciences
pGEX-4-T2-RhoD	Amp ^r	1185	Zanata et al., 2002
pGEX-4-T2-RhoDY46F	Amp ^r	1319	diese Arbeit
pGEX-4-T2-RhoDT49S	Amp ^r	1320	diese Arbeit
pGEX-4-T2-RhoDF51G	Amp ^r	1321	diese Arbeit
pGEX-4-T2-RhoDY54G	Amp ^r	1322	diese Arbeit
pcDNA3-myc-Dia-2C-GBD	Amp ^r	1748	Gasman et al., 2003
pcDNA3-myc-Dia-2C	Amp ^r	1749	Gasman et al., 2003
pcDNA3-myc-Dia-2C Δ GBD	Amp ^r	1750	Gasman et al., 2003
pGEX-5X-3	Amp ^r	742	Amersham Biosciences

pGEX-5X-3-Dia-2C-GBD	Amp ^r	1751	diese Arbeit
pBK-CMV-GFP-Rnd1	Kana ^r	1053	Zanata et al., 2002
pBK-CMV-GFP-Rac1L61	Kana ^r	1227	Ridley et al., 1992
pGEX-4-T1-cRaf-RBD	Amp ^r	1752	MPI, Dortmund

Tabelle 1: Verwendete Plasmide. Die aufgeführten Plasmide wurden in dieser Arbeit für Klonierungen benutzt oder dienten als Expressionsvektoren für eukaryotische Zellen oder Bakterien.

2.1.13 Synthetische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Sema1	5' GGTCGTGGGAAGAGCCCTTAT 3'	Sequenzierung von Sema3AΔ3
Sema2	5' TCAGGGTTGTCACCTCTCTGGG 3'	Sequenzierung von Sema3AΔ3
Sema8a	5' TTCAGAACACTGGGGGCCGCTG CCCCCATCAGGACGGAG 3'	Klonierung von Sem3A-P1 (Mutagenese PCR)
Sema8b	5' CTCCGTCCTGATGGGGGCAGCG GCCCCCAGTGTTCCTGAA 3'	Klonierung von Sem3A-P1 (Mutagenese PCR)

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide. Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von Invitrogen bezogen und in dieser Arbeit zur Sequenzierung oder zur Mutagenese verwendet.

2.1.14 Antikörper

Antikörper	Referenz
Maus α-Flag M2, monoklonal, F3165	Sigma, Taufkirchen
Maus α-c-myc, monoklonal, 1667149	Roche Diagnostics, Mannheim
Ratte α-HA, H6908	Sigma, Taufkirchen
Maus α-VSV, monoklonal, 1667351	Roche Diagnostics, Mannheim
Maus α-GFP, monoklonal, MMS-118P	Babco, CA, USA
Ziege α-GST, 27-4577-01	Amersham Bioscience, Freiburg

Maus α -Tubulin, monoklonal, T 9026	Sigma, Taufkirchen
Ziege α -Maus, Peroxidase gekoppelt, 115035003	Dianova, Hamburg
Esel α -Ziege, Peroxidase gekoppelt, 705035003	Dianova, Hamburg
Ziege α -Ratte, Peroxidase gekoppelt, 112035003	Dianova, Hamburg
Ziege α -Maus-Alexa594, A-1105	Mobitec, Göttingen
Ziege α -Kanninchen-Alexa488, A-31566	Mobitec, Göttingen
Rhodamine-Phalloidin, R-415	MotiTec, Göttingen

Tabelle 3: Verwendete Antikörper. Die aufgeführten Antikörper wurden für indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Die alkalische Lyse ist eine einfache Methode, um die Plasmid-DNA einer kleineren Bakterienkultur zu gewinnen. Dazu wurden 2 ml Übernachtskultur (LB + Antibiotikum) 1 Minute bei 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet in 100 μ l Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lösung B wurden die Bakterien für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 150 μ l eisgekühlte Lösung C zugegeben, der Ansatz mehrfach invertiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und durch Zugabe von 1 ml 100% Ethanol die Plasmid-DNA gefällt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 rpm wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, vakuumgetrocknet und anschließend in 10-50 μ l Aqua bidest. gelöst.

2.2.1.2 Isolierung von DNA im präparativen Maßstab

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus einer 200 ml Übernachtskultur (LB + Antibiotikum), wurden die Bakterien bei 4°C und 5500 rpm (GSA-Rotor, Sorvall) pelletiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit einem Plasmid-Isolations-Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers.

2.2.1.3 Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA

Die enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für analytische Zwecke wurde 1 µg DNA in einem Volumen von 10 µl, für präparative Zwecke 5-10 µg DNA in einem Volumen von 30 µl verdaut. Das eingesetzte Volumen des Enzyms betrug maximal 1/10 des Gesamtvolumens des Ansatzes. Der Restriktionsverdau erfolgte für 2-12 Stunden bei 37°C.

2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen für spätere Klonierungen erfolgte mit Hilfe von spezifischen Primern über eine Polymerasekettenreaktion. Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Für die Amplifikation wurde als Template 1-5 µl cDNA oder 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Dem PCR-Ansatz wurden 5 µl 10X Polymerase-Puffer, 2 µl dNTP-Mix [10mM je dNTP], 1 µl je Primer [10 pmol/µl] und 1µl 50X Advantage Taq 2-Polymerase (Clontech) zugesetzt und mit Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR wurde in 30-40 Zyklen von Denaturierung, Annealing der Primer und Elongation im Thermocycler durchlaufen. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert.

2.2.1.5 DNA-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes erfolgte in Agarose-Flachbett-Gelen. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde 0,8 – 1,4% Agarose in 0,5X TBE-Puffer verwendet. Die Proben

wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6X DNA-Ladepuffer versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,5X TBE-Puffer bei 10-15 V/cm². Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gefärbt und auf einem UV-Transilluminator fotografisch dokumentiert. Als DNA-Größenmarker wurden 5 µl *1 kb Smart ladder* verwendet.

2.2.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einem präparativen Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte DNA-Fragment auf einer UV-Durchlichtbank detektiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Spitze des Reaktionsgefäßes wurde zuvor mit einer Kanüle perforiert und mit etwas steriler Watte gefüllt. Das isolierte DNA-Fragment in dem Reaktionsgefäß wurde für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingesetzt und für 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die gelöste DNA wurde in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen und durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach 45 Minuten Inkubation wurde die DNA durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm pelletiert. Die DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend für 5-10 Minuten vakuumgetrocknet. Die DNA wurde in 10-20 µl Aqua bidest. gelöst.

2.2.1.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Um eine Religation eines durch einen Restriktionsverdau linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA mit Hilfe einer alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurden nach einem Restriktionsverdau 20 µl des linearisierten Vektors mit 12 µl 10X Dephosphorylierungspuffer versetzt und in einem Gesamtvolumen von 120 µl nach Zugabe von 4 µl alkalischer Phosphatase für 1 Stunde bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fragment des linearisierten Vektors aus dem Agarosegel extrahiert.

2.2.1.8 Phosphorylierung und Auffüllen von 5' DNA-Enden

Durch die Amplifikation von DNA durch eine PCR entstehen DNA-Fragmente, die überhängende 5'-Enden haben, die nicht phosphoryliert sind. Damit diese Fragmente mit glatten Enden eines linearisierten, dephosphorylierten Vektors ligiert werden können, müssen die überstehenden Enden der Fragmente aufgefüllt und phosphoryliert werden. Dazu wurden 24 µl des über eine Gelelektrophorese gereinigten DNA-Fragmentes mit 8 µl 5X T4-DNA-Polymerase-Puffer, 4 µl 10X Polynukleotidkinase (PNK)-Puffer, 2 mM ATP, 1 mM dNTPs, 1 µl PNK (10 Units) und 1 µl T4-DNA-Polymerase (1 Unit) versetzt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel eluiert und mit einem entsprechenden Vektor ligiert.

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wird durch die DNA-Ligase katalysiert. Das Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch eine 3'-OH-Gruppe mit einer 5'-Phosphat-Gruppe kovalent unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Für die Ligation eines DNA-Fragmentes mit einem linearisierten Vektor wurde im Standardansatz 1 µl des gereinigten Vektors, 7 µl des gereinigten DNA-Fragmentes, 1 µl Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase gemischt. Der Ligationsansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gemessen. 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml RNA entsprechen einer OD_{260} von 1,0. Durch das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} lässt sich eine Aussage über den Grad der Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen machen. Bei reinen Nukleinsäuren liegt der Quotient OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0.

2.2.1.11 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Maushirn oder COS-7 Zellen erfolgte mit *peqGOLD RNA PURE* (Peqlab). Dazu wurde pro 100 mg Maushirn oder 10 cm-Schale COS-7 Zellen 1 ml *peqGOLD RNA PURE* zugegeben. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde pro eingesetzten ml *peqGOLD RNA PURE* 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben 15 Sekunden gevortext. Nach weiterer Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetzten ml *peqGOLD RNA PURE* 15 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert und durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm pelletiert. Die RNA wurde 2X mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst.

2.2.1.12 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für eine spätere Amplifikation von cDNA-Sequenzen wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wird durch die Reverse-Transkriptase katalysiert. 1 µg Gesamt-RNA wurde zusammen mit 3 µl Oligo-dT-Primern in einem Gesamtvolumen von 10,5 µl 10 Minuten bei 65°C inkubiert. In diesem Schritt werden Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst und die Hybridisierung der Primer begünstigt. Der Ansatz wurde auf Eis gestellt und 4 µl 5X RT-PCR-Puffer, 2 µl DTT [100mM], 2 µl dNTP-Mix [10 mM pro dNTP], 0,5 µl RNase-Inhibitor [40 Units/µl] und 1 µl Reverse Transkriptase [50 Units/µl] zugegeben. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 42°C in einem Thermocycler inkubiert.

2.2.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode (Sanger et al., 1977) mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (Amersham Biosciences) unter Verwendung eines Sequenzier-Kits nach Anleitung des Herstellers. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms HUSAR (DKFZ, Heidelberg).

2.2.1.14 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

Eine 1000 ml-Bakterienkultur in exponentieller Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6 - 0,7$) wurde im Eisbad 30 Minuten gekühlt, durch Zentrifugation bei 6000 rpm (GSA-Rotor, Sorvall) für 10 Minuten sedimentiert, in 1000 ml sterilem, eisgekühltem Aqua bidest. resuspendiert und wie zuvor sedimentiert. Die Waschschrte wurden 3X wiederholt, wobei das Volumen der Kultur jeweils um die Hälfte reduziert wurde. Anschließend erfolgte ein Waschschrte mit eisgekühltem 10% Glycerol. Das Zellpellet wurde in 2 ml 10% Glycerol resuspendiert. Je 100 μ l-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.15 Transformation durch Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Bakterien kurzen elektrischen Impulsen ausgesetzt. Hierbei entstehen kurzzeitig Poren in der Plasmamembran, durch die DNA in die Zelle gelangen kann. 100 μ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 μ l DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde im BioRad Gene-Pulser bei 2,5 kV durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 45 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Konstruktion von Expressionsvektoren

2.2.2.1 Klonierung von AP-Sema3A Δ 3

Der Baculovirus Expressionsvektor pAcGP67B-Sema3A-65K Δ 3 (Antipenko et al., 2003) wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRV und SanDI verdaut, wobei ein DNA-Fragment (Aminosäuren 109 – 531), das die Deletion enthält, aus dem Vektor herausgeschnitten wurde. Der Expressionsvektor pBK-CMV-AP-Sema3A wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoRV und SanDI linearisiert und mit dem gereinigten DNA-Fragment ligiert. Das entstandene Konstrukt wurde nach Amplifikation in Bakterien zur Kontrolle sequenziert.

2.2.2.2 Konstruktion von Sema3A-P1

Die Mutagenese der Aminosäurereste Histidin 207, Histidin 208 und Histidin 209 von AP-Sema3A zu Alanin erfolgte über eine PCR mit *Quik Change® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers. Bei dieser Mutagenese-PCR können Basen durch spezifische Primer, die die gewünschte Mutation tragen ausgetauscht werden. Dazu wurden 30 ng DNA (pBK-CMV-AP-Sema3A), 5 µl 10X Polymerase-Puffer, 1,25 µl je Primer [100 ng/µl], 1 µl dNTP-Mix, 1 µl *PfuUltra™ High-Fidelity* DNA-Polymerase [2,5 Units/µl] mit Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt. Das folgende PCR-Programm wurde im Thermocycler mit 18 Zyklen (Schritte 2 – 4) durchlaufen.

1. Denaturierung	95°C	30 Sekunden
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden
3. Annealing	58°C	60 Sekunden
4. Elongation	68°C	8,5 Minuten

Nach der PCR wurde die DNA mit 1 µl des Restriktionsenzym DpnI [10 Units/µl] verdaut. Dieses Enzym erkennt und schneidet methylierte und hemimethylierte DNA und verdaut somit die parentale DNA. Mit den entstandenen mutierten Plasmide wurden XL-1-Blue superkompetente Zellen des Herstellers transformiert.

2.2.2.3 Klonierung der GST-RhoD „Effektor loop“ Mutanten

Die „Effektor loop“ Mutanten RhoDY46F, RhoDT49S, RhoDF51G und RhoDY54C wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI aus dem Expressionsvektor GFP-pBK-CMV herausgeschnitten. Der Expressionsvektor pGEX-4T-2 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI linearisiert und mit den gereinigten DNA-Fragmenten ligiert.

2.2.2.4 Klonierung von GST-Dia2C-GBD

Die Dia2C-GTPase-Binde-Domäne (Dia2C-GBD) wurde aus dem Expressionsvektor myc-pcDNA3-Dia2C-GBD (Gasman et al., 2003) durch Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und XbaI herausgeschnitten. Der Vektor pBluescriptSK(+/-) wurde ebenfalls mit diesen Enzymen linearisiert und mit dem gereinigten DNA-Fragment ligiert. Anschließend wurde Dia2C-GBD mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI aus dem Vektor wieder herausgeschnitten und mit dem Expressionsvektor pGEX-5X-3 ligiert, der ebenfalls mit EcoRI und NotI linearisiert wurde. Die Zwischenklonierung in den pBluescript Vektor war erforderlich, da für eine direkte Klonierung in den pGEX-5X-3 Vektor keine passenden Restriktionsschnittstellen zur Verfügung standen.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Aufreinigung und Analyse von rekombinanten Proteinen wurden transfizierte HEK 293T Zellen mit 10 ml eiskaltem PBS gerntet und bei 1000 rpm (Omnifuge, Heraeus) für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert, bei 2000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) für 1 Minute zentrifugiert und anschließend in 1 ml 1X TLB-Puffer („Pulldown“-Assay) oder in 0,4 ml IP-Lysepuffer (Immunpräzipitation) aufgenommen. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 4°C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert und das Proteinlysat anschließend für 30 Minuten bei 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zu analysierenden Proteine.

2.2.3.2 Expression von GST-Fusionsproteinen

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden M15-Zellen mit dem entsprechenden Expressionsvektor (pGEX-4T-2 oder pGEX-5X-3) transformiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Einzelkolonie eine 25 ml Vorkultur angeimpft (LB-Medium + Kanamycin + Ampicillin), die für 5 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert wurde. Mit der Vorkultur wurde eine 500 ml Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Die Induktion

der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG und Inkubation für 16 Stunden bei 20°C im Schüttler.

2.2.3.3 Aufschluss von Bakterienkulturen

Der Aufschluss von Bakterienkulturen erfolgte in einer *French Pressure Cell Press* (Thermo Spectronic). Dazu wurde eine 500 ml Bakterienkultur für 15 Minuten bei 4°C und 6000 rpm (GSA-Rotor, Sorvall) zentrifugiert und das Pellet mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nochmals für 15 Minuten bei 4°C und 4000 rpm (Omnifuge, Heraeus) zentrifugiert und anschließend in 10 ml Bakterien-Lysepuffer resuspendiert. Die Zelle der *French Pressure Cell Press* wurde 3X mit eiskaltem Aqua bidest. und 1X mit Bakterien-Lysepuffer gewaschen. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte in 3 Durchläufen bei 500 kPa. Anschließend wurde das Lysat 30 Minuten bei 4°C und 16.000 rpm (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert und der Überstand in 500 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose

Mit GST (Glutathion S-Transferase) fusionierte Proteine können durch die Bindung an Glutathion-Sepharose immobilisiert werden. Es wurden 30 µl Glutathion-Sepharose 1X mit PBS gewaschen, 1 Minuten bei 2000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) pelletiert und anschließend für 1 Stunde bei 4°C im Überkopf-Schüttler mit dem das GST-Fusionsprotein enthaltene Bakterienlysate inkubiert. Die Glutathion-Sepharose wurde 3X mit 1 ml 1X Bindepuffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde für 1 Minute bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Das immobilisierte GST-Fusionsprotein wurde für einen „Pull-down-Assay“ eingesetzt.

2.2.3.5 Beladung von GST-GTPasen mit GTP γ S

Nach der Kopplung an Glutathion-Sepharose wurden als GST-Fusionsprotein exprimierte GTPasen mit GTP γ S beladen. Bei GTP γ S handelt es sich um ein nicht-hydrolysierbares GTP-

Analog, durch das die GTPase in einem aktiven Zustand verbleibt. Zu den an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-GTPasen wurden 35 μl 1X Bindepuffer, 5 μl EDTA [50 mM] und 5 μl GTP γ S [10 mM] zugegeben und für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 12,5 μl MgCl₂ [0,1 mM] gestoppt. Die mit GTP γ S beladenen GTPasen wurden weiter im „Pull-down“-Assay eingesetzt.

2.2.3.6 „Pull-down“-Assay

Der „Pull-down“-Assay dient der Untersuchung einer Interaktion zweier Proteine. Das erste Protein wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert, an Glutathion-Sepharose gekoppelt und für 1 Stunde bei 4°C in einem Überkopf-Schüttler mit dem Lysat von HEK 293T Zellen inkubiert. Dies Lysat enthielt das überexprimierte Protein, das als möglicher Interaktionspartner für das GST-Fusionsprotein untersucht werden sollte. Danach wurde die Glutathion-Sepharose 3X mit PD-Waschpuffer gewaschen. Zwischen den Waschschrinen wurde die Matrix für 1 Minute bei 4°C und 2000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) pelletiert. Anschließend wurde nochmals für 2 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert, um den restlichen Puffer zu entfernen. Durch Zugabe von 25 μl 1X SDS-Probenpuffer und 5 Minuten Inkubation auf einem Schüttler wurden die gebundenen Proteine eluiert. Die Matrix wurde durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 rpm pelletiert und der die Proteine enthaltene Überstand abgenommen. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion.

2.2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-PAGE. Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wurden Trenngele mit 7,5%, 10% oder 12,5% Polyacrylamid verwendet. Die Proteine wurden vor der Gelelektrophorese für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Zur Bestimmung der Größen der aufgetrennten Proteine wurde ein *High Molecular Weight Marker* (Sigma) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt bei 20 – 30 mA in 1X SDS-Laufpuffer.

2.2.3.8 Coomassie-Färbung von Proteinen

Um die Proteine nach einer SDS-PAGE im Gel sichtbar zu machen, wurde das Polyacrylamidgel für 1 Stunde bei leichtem Schwenken mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt. Unspezifisch gebundener Farbstoff wurde für 3 – 12 Stunden mit Entfärbelösung entfernt.

2.2.3.9 Western-Blot

Zum Transfer von Proteinen von einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran wurde diese durch Inkubation für 1 Minute in Methanol aktiviert. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten in Aqua bidest. und 10 Minuten in Blot-Puffer gewaschen. Das Polyacrylamidgel wurde ebenfalls vor dem Transfer für 5 Minuten in Blot-Puffer equilibriert. In eine Kassette wurde auf die zur Anode zeigenden Seite ein der Größe des Gels entsprechendes Schaumstoffstück, ein Whatman 3 MM-Papier, die aktivierte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel, ein weiteres Whatman 3-MM Papier und ein Schaumstoffstück gelegt. Alle Utensilien wurden zuvor in Blot-Puffer getränkt. Die geschlossene Kassette wurde in den mit Blot-Puffer gefüllten Tank (Biorad) eingesetzt. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei 100 V.

2.2.3.10 Immundetektion von Proteinen

Zum Nachweis von Proteinen auf der PVDF-Membran wurden spezifische Antikörper gegen die entsprechenden Proteine eingesetzt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde diese zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer bei leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3X für 5 Minuten mit PBS oder 3X 10 Minuten mit PBS mit 0,3% Tween-20 gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper-Peroxidase-Konjugat inkubiert und 3X wie zuvor gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Sekundärantikörper über eine Chemolumineszenz-Reaktion der Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen. Dazu wurde die Seite der Membran, auf die die Proteine transferiert wurden, für 2 Minuten mit einem Gemisch der Detektions-Reagenzien 1 und 2 des ECL-Systems inkubiert. Nach Abtropfen der

Flüssigkeit wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen und die Chemolumineszenz-Signale für 30 Sekunden – 30 Minuten mit einer Kamera (*LAS-1000*) aufgenommen und mit dem Programm *Image Reader LAS-1000* abgebildet.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung	Blockpuffer
α -VSV	1:2000	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blockpuffer I
α -GFP	1:25 000	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blockpuffer I
α -myc	1:500	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blockpuffer I
α -Flag	1:10 000	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blockpuffer I
α -GST	1:4000	Esel α -Ziege HRP	1:10 000	Blockpuffer II

Tabelle 4: In der Western-Blot-Analyse eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden in den aufgeführten Verdünnungen und Blockpuffern eingesetzt.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden nach zügigem Auftauen im 37°C Wasserbad in 15 ml-Kulturröhrchen mit 10 ml vorgewärmten Medium überführt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 rpm (Omnifuge, Heraeus) wurde das Medium abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml vorgewärmten Medium resuspendiert und in eine 10 cm-Kulturschale überführt.

2.2.4.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultur von HEK 293T Zellen, COS-7 Zellen und Shep-SF Zellen erfolgte in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C. Zum Passagieren der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, durch Inkubation für 1 – 5 Minuten mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C abgelöst und in einer geeigneten Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt. Die Kultivierung von HEK 293T Zellen erfolgte in MEM-Medium mit 10% FCS, die Kultivierung von COS-7 Zellen in DMEM-Medium mit 10% FCS und die Kultivierung von Shep-SF Zellen in RPMI-

Medium mit 10% FCS. Zur Verhinderung von Bakterienkontaminationen wurde den Medien 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

2.2.4.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurde das Medium von adhärent gewachsenen Zellen abgesaugt, die Zellen durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C abgelöst und mit 10 ml Medium gemischt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 rpm (Omnifuge, Heraeus) wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (Dimethylsulfoxid + Kulturmedium im Verhältnis 1:9) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in einem Isopropanolbad über Nacht langsam auf -80 °C gefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.4.4 Transfektion von Zellen

Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK 293T

Zur transienten Expression rekombinanter Proteine wurden HEK 293T Zellen mittels Calciumphosphat Kopräzipitation transfiziert. Für Transfektionen von Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden konfluente HEK 293T Zellen einen Tag vor der Transfektion 1:4 passagiert, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70 – 80% erreichten. Pro 10 cm-Kulturschale wurden 750 µl H₂O mit 12 µg DNA, 250 µl 1 M CaCl₂ und 1 ml 2X BBS-Puffer gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Kulturmedium zugegeben. Das Medium der HEK 293T Zellen wurde durch den Transfektionsansatz ersetzt und die Zellen für 5 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz wieder abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium zugegeben.

Für Transfektionen in 24-well-Platten wurden die Zellen einer konfluent gewachsenen 10 cm-Kulturschale einen Tag vor der Transfektion in 10 ml Medium aufgenommen und jeweils 4 ml Zellsuspension mit 46 ml Medium gemischt. Pro „Well“ wurde 1 ml der verdünnten Zellsuspension ausgesät. Am nächsten Tag wurden in einem Transfektionsansatz für 12 „Wells“ 675 µl H₂O mit 9 µg DNA, 225 µl 1 M CaCl₂ und 900 µl 2X BBS-Puffer gemischt.

Nach Inkubation für 5 Minuten wurden 7,2 ml Medium zugegeben und jeweils 750 µl des Transfektionsansatzes auf die „Wells“ verteilt, von denen zuvor das Medium abgesaugt wurde. Die weiteren Schritte erfolgten wie zuvor beschrieben.

Transfektion von COS-7 Zellen durch Lipofektion

Zur transienten Expression rekombinanter Proteine wurden COS-Zellen durch Lipofektion mit *FuGene6* transfiziert. Dazu wurden konfluent gewachsene COS-7 Zellen einer 10 cm-Schale einen Tag vor der Transfektion durch Trypsinierung abgelöst und mit Medium 1:250 verdünnt. In einer 24-well-Platte wurde pro „Well“ 1 ml Zellsuspension auf Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit *FuGene6* transfiziert. Dazu wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 1,5 µg DNA vorgelegt. Es wurden 900 µl serumfreies Medium mit 13,5 µl *FuGene6* gemischt und nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf 3 DNA-Ansätze verteilt. Nach Inkubation für 15 Minuten wurde jeder Transfektionsansatz tropfenweise auf 3 „Wells“ der 24-well-Platte verteilt. Die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Bei der Transfektion von Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden die Zellen einer konfluent gewachsenen Kulturschale am Tag vor der Transfektion 1:8 passagiert. Für die Transfektion wurde pro Kulturschale 12 µg DNA, 2400 µl serumfreies Medium und 36 µl *FuGene6* eingesetzt.

2.2.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis rekombinanter Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz wurden transfizierte COS-7 Zellen mit PBS gewaschen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Zellen wurden 2X für 1 – 5 Minuten mit PBS gewaschen und zur Analyse von zytosolischen Proteinen mit 0,5% Triton X-100 in PBS für 2 Minuten permeabilisiert und anschließend 2X für 1 – 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern, wurden die Zellen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 Minuten mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen mit dem in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper in einer abgedunkelten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die

Deckgläschen im Dunkeln 3X mit PBS und 1X mit Aqua bidest. gewaschen und mit *Fluorescent Mounting Medium* auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
α -VSV	1:500	α -Maus-Alexa594	1:1000
α -myc	1:500	α -Maus-Alexa594	1:1000
α -Tubulin	1:300	α -Maus-Alexa594	1:1000
α -HA	1:500	α -Ratte-Alexa488	1:1000

Tabelle 5: In der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden in den aufgeführten Verdünnungen eingesetzt.

2.2.4.6 Gewinnung von rekombinatem AP-Sema3A

Zur Gewinnung von rekombinatem AP-Sema3A diente eine stabile Zelllinie (HEK 293 Zellen), die AP-Sema3A exprimiert (HEK293-717; Rohm et al., 2000). Die Zellen wurden in MEM Medium mit 10% FCS in Anwesenheit von Geneticin (1 mg/ml) kultiviert. Für die Gewinnung von rekombinatem AP-Sema3A Δ 3 und AP-Sema3A-P1 wurden HEK 293T Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Zur Herstellung konditionierten Mediums wurden konfluente Zellen (stabile Zelllinie) oder transfizierte Zellen für 2 Tage mit serumfreiem Medium ohne Geneticin inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und für 10 Minuten bei 4000 rpm (Omnifuge, Heraeus) zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Nach Bestimmung der AP-Sema3A Konzentration durch einen AP-Assay wurde das Medium gegebenenfalls durch Zentrifugation bei 3000 rpm mit *Amicon Ultra*-Zentrifugationsfilter konzentriert. Das konzentrierte Medium wurde bis zu 2 Wochen bei 4°C gelagert.

2.2.4.7 AP-Assay zur Bestimmung der Sema3A-Konzentration

Die Fusion von Sema3A mit der alkalischen Phosphatase erlaubt die Bestimmung der Konzentration des Proteins. Bei diesem Assay wird ein Substrat zugegeben, dessen Umsetzung durch die alkalische Phosphatase zur Bildung eines Produkts führt, dessen

Konzentration bei 405 nm gemessen werden kann. Zur Inaktivierung von endogenen Phosphatasen wurden 100 µl AP-Sema3A enthaltene Medium für 45 Minuten bei 65°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente Kulturmedium von HEK 293T Zellen, die kein AP-Sema3A exprimierten. Es wurden 10 µl AP-Substrat, 10 µl 1 M Tris pH 9,5 und 10 µl inaktiviertes Medium gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Tris pH 7,5 gestoppt. Die optische Dichte der Proben wurde bei 405 nm gemessen. Für die weiteren Versuche wurde 1 Einheit Sema3A (1 U AP-Sema3A) eingesetzt, welche als die Konzentration definiert ist, die einer OD₄₀₅ von 1,0 entspricht.

2.2.4.8 Nrp-1 Bindungs-Assay

Durch die Fusion von Sema3A mit der alkalischen Phosphatase lässt sich durch eine Farbreaktion die Bindung von Sema3A an Zellen detektieren. Es wurden COS-7 Zellen in einer 24-well-Platte mit dem Expressionsvektor für HA-Nrp-1 oder als Negativkontrolle mit dem Vektor pBK-CMV durch Lipofektion mit *FuGene6* transfiziert. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgesaugt, durch AP-Sema3A enthaltene Medium ersetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde wieder abgenommen, die Zellen für 15 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation für 15 Minuten mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Es wurde nochmals für 5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor die Zellen zur Inaktivierung von endogenen Phosphatasen für 45 Minuten bei 65°C inkubiert wurden. Nach einem Waschschrift mit AP-Puffer und Levamisol (0,03 g/50 ml) für 5 Minuten wurden die Zellen für mehrere Stunden bei Raumtemperatur mit AP-Färbelösung inkubiert, bis eine deutliche Färbung der Zellen unter dem Lichtmikroskop zu erkennen war.

2.2.4.9 Quantitativer Nrp-1 Bindungs-Assay

Da der zuvor beschriebene Bindungs-Assay für eine quantitative Bestimmung von Bindungsaffinitäten nicht geeignet ist, wurde zusätzlich ein quantitativer Bindungs-Assay durchgeführt. Hierzu wurden HEK 293T Zellen in 24-Well-Platten, die zuvor mit Poly-L-Ornithin beschichtet wurden, ausgesät und am nächsten Tag mit dem Expressionsvektor für HA-Nrp-1 oder als Kontrolle mit dem Vektor pBK-CMV mittels Calciumphosphat

Kopräzipitation transfiziert. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgesaugt, durch AP-Sema3A enthaltenes Medium ersetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 3X mit PBS gewaschen und die Zellen jeden „Wells“ mit 200 µl 1% Triton in AP-Puffer lysiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurden die Überstände abgenommen und für 45 Minuten bei 65°C inkubiert. Jeweils 100 µl Medium wurden mit 100 µl AP-Substratlösung bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Die optische Dichte wurde im ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt.

2.2.4.10 COS-7 Kollaps-Assay

COS-7 Zellen wurden auf unbeschichteten Deckgläschen in einer 24-Well-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit den Expressionsvektoren für HA-Nrp-1, VSV-Plexin-A1 und gegebenenfalls einem weiteren Expressionsvektor transfiziert. Pro Transfektionsansatz (für 3 „Wells“) wurden 1 µg VSV-Plexin-A1 und 0,5 µg HA-Nrp-1 eingesetzt. Für eine Transfektion mit 3 verschiedenen Plasmiden wurden in der Regel 0,7 µg VSV-Plexin-A1, 0,4 µg HA-Nrp-1 und 0,4 µg des 3. Plasmids eingesetzt. Nach 2 Tagen wurden das Medium durch AP-Sema3A enthaltenes Medium ersetzt ($OD_{405} = 1,0$) und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1X mit PBS gewaschen, fixiert und die entsprechenden Proteine durch eine indirekte Immunfluoreszenz detektiert.

2.2.4.11 Shep-SF Kollaps-Assay

Shep-SF Zellen wurden auf unbeschichteten Deckgläschen ausgesät und mehrere Tage bei 37°C inkubiert, bis eine 90%ige Konfluenz erreicht war. Dann wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit AP-Sema3A inkubiert, fixiert und permeabilisiert. Mikrotubuli und Aktinfilamente wurden durch eine indirekte Immunfluoreszenz mittels α -Tubulin Antikörper als primäre und α -Maus Alexa488 Antikörper als sekundäre Antikörper bzw. Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin nachgewiesen.

2.2.4.12 Isolierung von Membranfraktionen aus COS-7 Zellen

Zur Analyse von rekombinanten Membranproteinen wurden die Membranfraktionen von transfizierten COS-7 Zellen aufgereinigt. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm (Omnifuge, Heraeus) pelletiert, in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte über eine Ultraschallbehandlung (Sonikator, Braun Biotech International) für 2X 30 Sekunden (Amplitude: 80; Cycle: 0,6) mit einer Pause von 90 Sekunden. Anschließend wurden die Ansätze für 20 Minuten bei 4°C und 2900 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert, um Zellkerne und größere Zellreste zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und in einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) bei 4°C und 75.000 rpm (Rotor TLA110) für 40 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet pro Ausgangs-Kulturschale in 50 µl Resuspensions-Puffer gelöst. Das Vorhandensein der zu untersuchenden Membranproteine wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot kontrolliert.

2.2.5 Fluoreszenzspektroskopische Messung der GTP-Hydrolyse

Werden Elektronen eines Moleküls durch die Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge vom Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gehoben, wird durch das Zurückfallen in den Zustand niedrigerer Energie die Energiedifferenz in Form von Wärme und Strahlung frei. Die Strahlungsemission wird als Fluoreszenz bezeichnet. Da die Polarität der Umgebung Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des Moleküls hat, ermöglicht die Fluoreszenzspektroskopie die zeitaufgelöste Messung von Polaritätsänderungen in der Umgebung des Fluorophors. Um die GTP-Hydrolyse von GTPasen zeitaufgelöst verfolgen zu können, wurde ein Nukleotidanalogue verwendet, das mit einer fluoreszierenden Gruppe modifiziert ist (TAMRA-GTP, MPI Dortmund; Abb. 11). TAMRA-GTP wurde zuvor durch Nukleotidaustausch an die jeweilige GTPase gebunden. Durch die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP kommt es zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals, die gemessen werden kann. Die Messung der GTP-Hydrolyse von H-Ras und R-Ras in Anwesenheit oder Abwesenheit von gereinigten Membranfraktionen transfizierter COS-7 Zellen erfolgte mit Hilfe einer „Stopped-Flow“-Apparatur (Applied Photophysics SX16MV). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der automatischen Injektion zweier Lösungen in eine Messzelle und dem

Aufnahmen des Fluoreszenzsignals. Lösung 1 enthielt das an die GTPase gebundene TAMRA-GTP und Lösung 2 die Membranfraktion bzw. als Positivkontrolle NF1-333 GAP. Als Endkonzentration wurden 100 nM H-Ras bzw. R-Ras, 60 µl Membranfraktion/ml in 1X Messpuffer eingesetzt. Die Exzitation erfolgte bei 546 nm, die Emission wurde hinter einem Kantenfilter bei Wellenlängen unterhalb von 570 nm mit einem Photomultiplier gemessen. Jede Messung wurde bei 20°C durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm GraFit 5 (Erithacus Software Ltd.). Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Ahmadian am MPI in Dortmund (Abteilung für Strukturelle Biologie, Prof. Dr. Wittinghofer) durchgeführt.

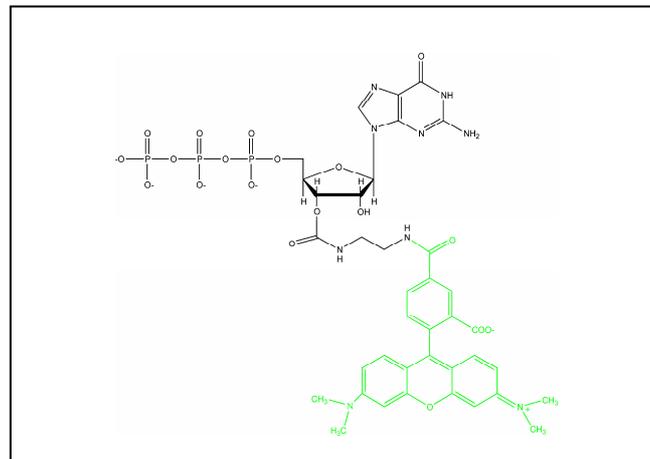


Abb. 11: TAMRA-GTP. In der Fluoreszenzspektroskopie wurde das GTP-Analog TAMRA-GTP verwendet (MPI, Dortmund). Das Molekül trägt eine fluoreszierende Gruppe (grün), durch die eine Messung der GTP-Hydrolyse möglich ist.

3 Ergebnisse

3.1 Kristallstruktur-basierende Analyse von Sema3A

Die Struktur der für alle Semaphorine charakteristischen Semaphorin-Domäne war zu Beginn dieser Experimente unbekannt. Für eine spätere Kristallstrukturanalyse sollte im ersten Teil dieser Arbeit die biologische Aktivität eines 65 kDa Fragmentes von Sema3A (Sema3A-65K), welches die vollständige Semaphorin-Domäne enthält, bestimmt werden. Die Expression des Proteins und die Kristallstrukturanalyse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nikolov am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York. Weiterhin sollten in dieser Arbeit auf Basis der vorliegenden Strukturdaten die Bindungsstellen für die Rezeptoruntereinheiten Nrp-1 und Plexin-A1 durch gezielte Mutagenese bestimmt werden.

3.1.1 Bestimmung der biologischen Aktivität von Sema3A-65K

Die Aktivität von Sema3A-65K (Aminosäurereste 26 – 546) wurde mittels des COS-7 Kollaps-Assays (Takahashi et al., 1999; Zanata et al., 2002) bestimmt. Bei diesem Assay führt die heterologe Koexpression von Plexin-A1 und Nrp-1 in COS-7 Zellen zur Bildung eines funktionellen Rezeptors für Sema3A. Nach Bindung des Liganden und Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Depolymerisierung der Aktinfilamente und dem Kollaps der Zellen. Morphologisch ist dieser Zellkollaps durch einen kontrahierten Zellkörper und lange filopodienartige Ausläufer gekennzeichnet (Abb. 12A). COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1 und HA-Nrp-1 transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen von Sema3A-65K inkubiert. Anschließend wurde die Expression von Plexin-A1 durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Der Anteil der kollabierten, Plexin-A1-positiven Zellen wurde bestimmt und der EC₅₀-Wert für die Kollaps-induzierende Aktivität errechnet. Der EC₅₀-Wert gibt die Konzentration an, bei der 50% des maximalen Effekts erreicht wird.

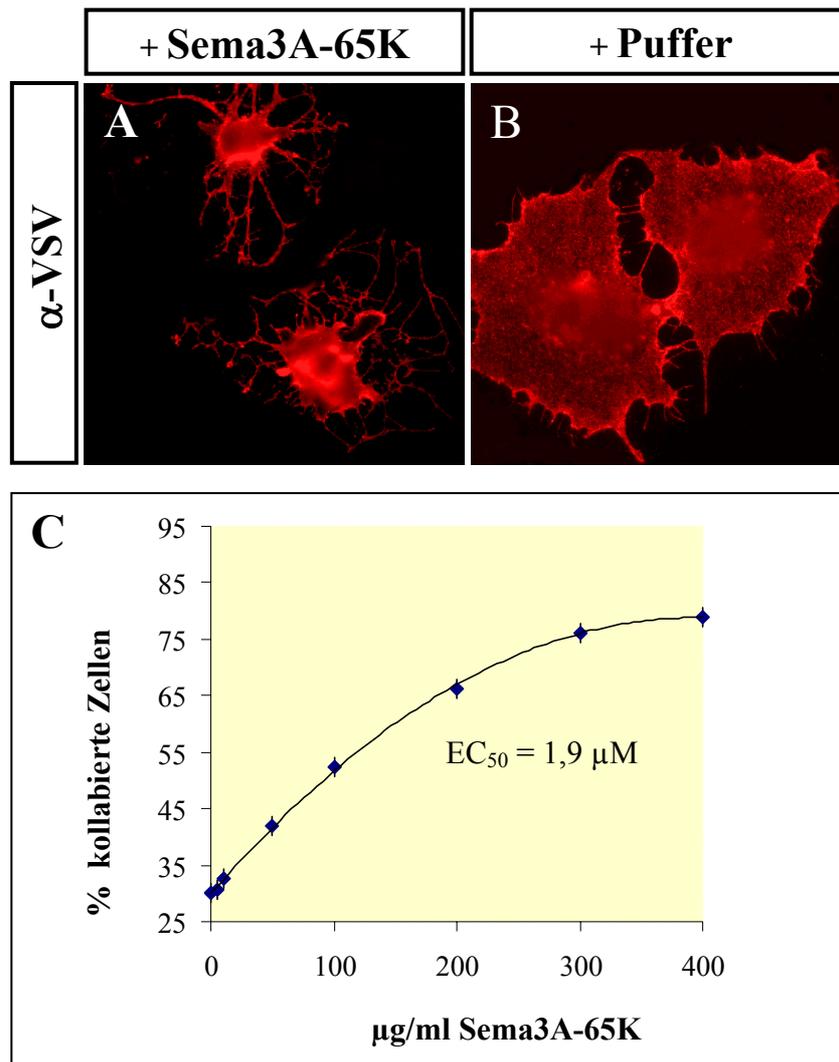


Abb. 12: Aktivität von Sema3A-65K im COS-7 Kollaps-Assay. COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1 und HA-Nrp-1 transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit (A) 300 μ g/ml Sema3A-65K in Medium oder (B) als Negativkontrolle mit Resuspensions-Puffer in Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Expression von Plexin-A1 mittels eines α -VSV Antikörpers als primären und eines α -Maus-Alexa594 Antikörpers als sekundären Antikörper detektiert. (C) Mittels einer Verdünnungsreihe von Sema3A-65K wurde im gleichen Assay ein EC_{50} -Wert von 1,9 μ M bestimmt (n = 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 x 300 Zellen).

Nach Inkubation transfizierter COS-7 Zellen mit Puffer kollabierten $29,8 \pm 1,4\%$ der Plexin-A1-positiven Zellen. Dieser Kollaps in der Abwesenheit von Sema3A wird vermutlich größtenteils durch die Überexpression von Plexin-A1 ausgelöst. Bei Zugabe von 400 μ g/ml (6,77 μ M) Sema3A-65K kollabierten $78,9 \pm 0,56\%$ der Plexin-A1-positiven Zellen (Abb. 12). Der Prozentsatz kollabierter Zellen ist vergleichbar mit dem, der nach Inkubation mit Sema3A der vollen Länge erreichbar ist (Rohm et al., 2000b). Damit konnte deutlich die biologische Aktivität von Sema3A-65K gezeigt werden. Bei der Konzentration von 400 μ g/ml Sema3A-

65K wurde das Maximum der Aktivität erreicht. Mit einer Konzentrationsreihe wurde ein EC_{50} -Wert von $1,9 \mu\text{M}$ bestimmt (Abb. 12C). Dieser EC_{50} -Wert ist damit wesentlich höher als der des vollständigen Proteins (EC_{50} -Wert = $0,1 \text{ nM}$; Koppel et al., 1998).

3.1.2 Kristallstruktur von Sema3A-65K

In Zusammenhang mit dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur von Sema3A-65K in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nikolov am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York bestimmt, die hier nicht ausführlich beschrieben wird (Antipenko et al., 2003).

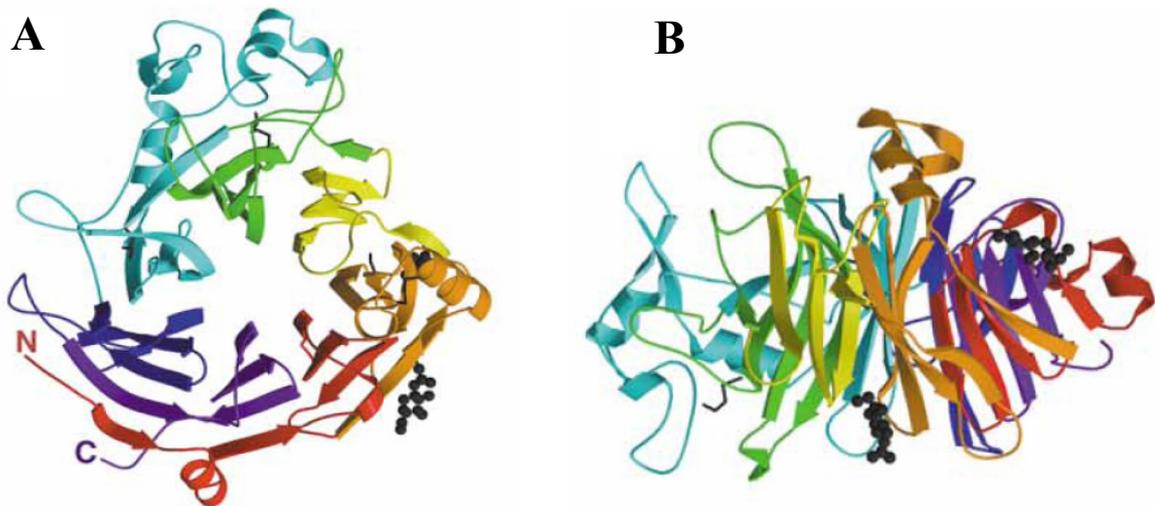


Abb. 13: Kristallstruktur von Sema3A-65K. Mittels eines MAD-Phasenexperiments wurde die Kristallstruktur von Sema3A-65K am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York bestimmt. Die Struktur wird von der Vorderseite des Moleküls (A) und entlang der Seite des Propellers (B) dargestellt. Die Sema3A-65K Pseudorepeats sind farblich und die Disulfidbrücken grau dargestellt (Antipenko et. al., 2003).

Die Kristallstrukturanalyse von Sema3A-65K zeigte, dass es sich bei der Semaphorin-Domäne um eine scheibenförmige Struktur mit einer Dimension von ungefähr $60 \times 70 \times 45 \text{ \AA}$ handelt (Abb. 13). Obwohl die Semaphorin-Domäne keine erkennbaren sich wiederholende Sequenzmotive enthält, ist die Faltung der Domäne unerwarteter Weise eine Variation der β -Propeller Struktur (Fulop and Jones, 1999; Paoli, 2001) mit sieben Schleifen, die um eine zentrale Achse angeordnet sind. Jede einzelne Schleife besteht aus einer β -Faltblattstruktur, die vier antiparallele β -Faltblätter enthält. Im Gegensatz zu den meisten bekannten β -Propeller Strukturen mit ungefähr 40 – 45 Aminosäureresten pro Schleife enthält jede Schleife der Semaphorin-Domäne 70 Aminosäuren. Zusätzliche helikale Strukturelemente

innerhalb der Schleifen vergrößern die Domäne. Vier Disulfidbrücken stabilisieren die Struktur, zwei befinden sich in der zweiten Schleife und zwei weitere verbinden die vierte und fünfte Schleife.

Im Kristall bilden zwei Sema3A-65K Monomere ein nicht-kovalentes Dimer, wobei jedes Monomer mit vier Schleifen an dieser Interaktion beteiligt ist (Abb. 14). Durch analytische Ultrazentrifugation wurde die Interaktion von Sema3A und seinem Rezeptor Nrp-1 untersucht (Antipenko et al., 2003). Diesen Ergebnissen zufolge ist Sema3A-65K in Lösung ein Dimer und geht durch die Bindung von monomerem Nrp-1 ebenfalls in einen monomeren Zustand über. Die Bindung des Rezeptors erfolgt demnach mit einer Stöchiometrie von 1:1.

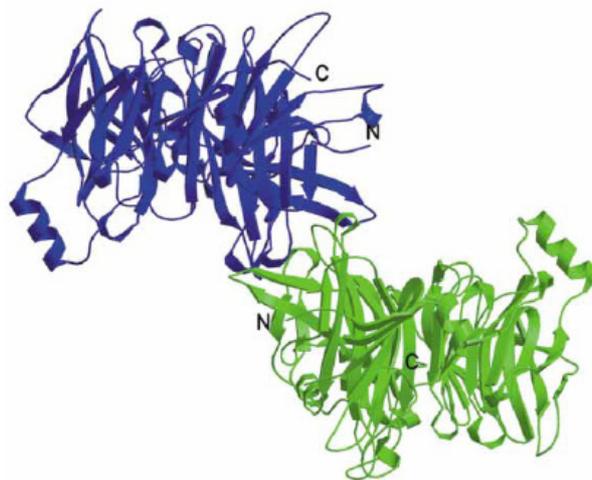


Abb. 14: Dimerbildung von Sema3A-65K. Die Kristallstrukturanalyse zeigte, dass Sema3A-65 im Kristall als nicht-kovalentes Dimer vorliegt (Antipenko et. al., 2003).

3.1.3 Identifizierung der Interaktionsstelle von Sema3A für Nrp-1

Die Tatsache, dass die Neuropilin-Bindung in Konkurrenz zu der Dimerisierung von Sema3A-65K steht, deutet darauf hin, dass die Bindungsstelle für Nrp-1 mit den für die Dimerisierung notwendigen Sequenzen überlappt. Während fast alle Klasse 3 Semaphorine Neuropiline binden und als Korezeptoren benötigen, interagiert das Klasse 4 Semaphorin Sema4D nicht mit Neuropilin, sondern direkt mit Plexin-B1 als Rezeptor. Deshalb kann eine Analyse der Verteilung konservierter Aminosäurereste anhand der Struktur Aufschluss über potentielle Interaktionsstellen geben. Abb. 15A zeigt alle an der Oberfläche gelegenen Aminosäurereste, die innerhalb der Klasse 3, jedoch nicht zwischen Klasse 3 und Klasse 4 Semaphorinen konserviert sind. Das einzige konservierte Profil an der Oberfläche (in

Abb. 15A markiert) überlappt mit der Dimerisierungsstelle von Sema3A-65K (Abb. 15B). Um zu bestätigen, dass es sich um die Nrp-1 Bindungsstelle handelt, wurden zwei Deletionsmutanten von Sema3A-65K hergestellt und analysiert (Abb. 15D). Die Deletionen sind in Abb. 15C farblich markiert. Bei Sema3A-65K Δ 1 handelt es sich um die Deletion der Aminosäurereste 252 – 260, welche sich in der vierten Schleife der Semaphorin-Struktur befinden (in Abb. 13 grün dargestellt). Bei Sema3A-65K Δ 2 handelt es sich um die Deletion der Aminosäurereste 359 – 366, die sich in der 5. Schleife befinden (in Abb. 13 türkis dargestellt). Beide Deletionsmutanten liegen in Lösung als Monomer vor und binden auch in hohen Konzentrationen nicht Nrp-1 (Antipenko et al., 2003).

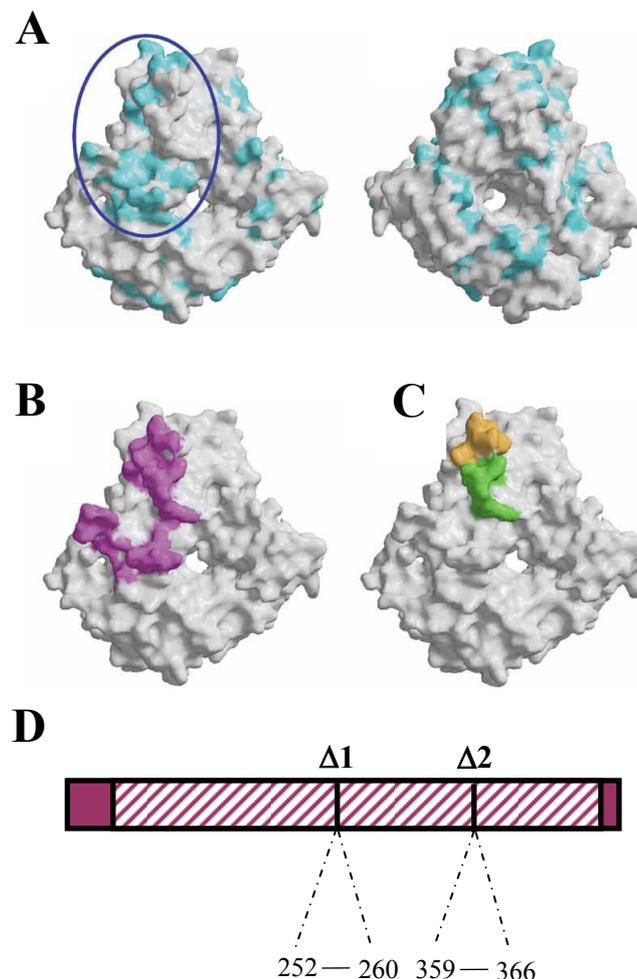


Abb. 15: Analyse konservierter Reste in Sema3A-65K. (A) Die an der Oberfläche liegenden Aminosäurereste, die innerhalb der Klasse 3 aber nicht zwischen Klasse 3 und Klasse 4 Semaphorinen konserviert sind, sind auf der Vorderseite (links) und der Rückseite (rechts) des Moleküls in türkis abgebildet. (B) Die Sema3A-65K Dimerisierungsstelle ist in violett markiert. (C) Die untersuchten Deletionen der potentiellen Nrp-1 Bindungsstelle sind in grün (Δ 1) und orange (Δ 2) dargestellt (Antipenko et. al., 2003). (D) Sema3A Δ 1 enthält eine Deletion der Aminosäurereste 252 – 260 und Sema3A Δ 2 eine Deletion der Aminosäurereste 359 – 366 innerhalb der Semaphorin-Domäne (schraffiert).

Mit Hilfe des COS-7 Kollaps-Assays wurde getestet, ob Sema3A-65K Δ 1 und Sema3A-65K Δ 2 noch Aktivität besitzen. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit den Expressionsvektoren für HA-Nrp-1 und VSV-Plexin-A1 transfiziert und nach 48 Stunden mit 300 μ g/ml Sema3A-65K Δ 1 oder Sema3A-65K Δ 2 für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Expression von Plexin-A1 durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen und der Prozentsatz kollabierter, transfizierter Zellen bestimmt. Als Positivkontrolle diente Sema3A-65K Wildtyp (WT). Im Gegensatz zu Sema3A-65K, das bei 300 μ g/ml einen Kollaps von $76 \pm 1,8\%$ der Plexin-A1-positiven Zellen induzierte, zeigten weder Sema3A-65K Δ 1 noch Sema3A-65K Δ 2 Aktivität (Abb. 17). Der Anteil kollabierter Zellen liegt bei beiden Deletionsmutanten im Bereich des Wertes der Negativkontrolle (Δ 1 = $24,8 \pm 1,5\%$; Δ 2 = $25 \pm 1,6\%$; Puffer = $27,3 \pm 1,3\%$ kollabierte Zellen). Damit konnte gezeigt werden, dass die deletierten Regionen innerhalb der Nrp-1 Interaktionsstelle der Semaphorin-Domäne für die Aktivierung des Rezeptors wesentlich sind.

3.1.4 Analyse einer potentiellen Plexin-Bindungsstelle von Sema3A

Viele Semaphorine wie die der Klassen 1, 2, 4 und 7 sind in der Lage ohne die Beteiligung eines Korezeptors direkt an Plexine zu binden. Eine direkte Interaktion zwischen Klasse 3 Semaphorinen und Plexinen konnte mit Ausnahme von Sema3E bisher nicht gezeigt werden. Eine Region von 70 Aminosäuren innerhalb der Semaphorin-Domäne (in Abb. 16 rot dargestellt) von Klasse 3 Semaphorinen bestimmt die Spezifität der Interaktion mit Rezeptoren (Koppel et al., 1997). Durch die Kristallstrukturanalyse wurde gezeigt, dass diese Region (Reste 166 – 235) die dritte Schleife der β -Propeller Struktur bildet (in Abb. 13 gelb dargestellt). Die größten Semaphorin/Semaphorin Kontakte, die durch die Kristallpackung entstehen, befinden sich an der gleichen Position. Es ist denkbar, dass diese Stelle eine biologisch relevante Interaktionsstelle darstellt, z.B. eine Bindungsstelle von Sema3A für die Semaphorin-Domäne von Plexin-A1, die möglicherweise erst nach Nrp-1 Bindung verfügbar wird.

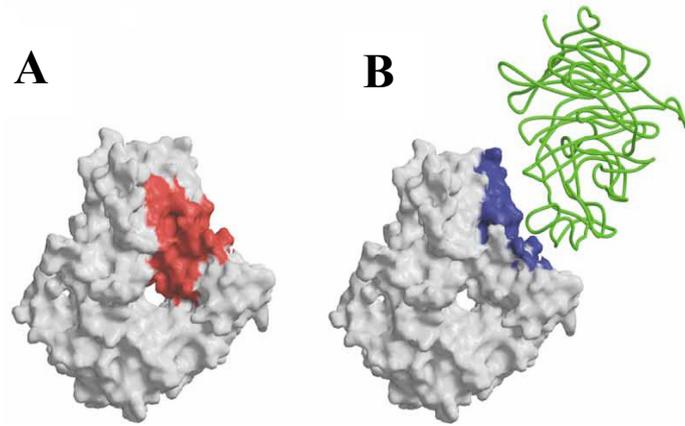


Abb. 16: Die potentiellen Plexin-Bindungsstelle in Sema3A-65K. (A) Eine Region von 70 Aminosäuren, welche die Präferenz von Semaphorinen für Rezeptoren bestimmt, ist in rot dargestellt. (B) Die Sema3A-65K Kontaktstelle im Kristall ist blau und das zweite interagierende Sema3A-65K Molekül grün dargestellt (Antipenko et. al., 2003).

Um zu untersuchen, ob Sema3A eine Bindungsstelle für Plexin besitzt, wurde eine weitere Deletionsmutante von Sema3A-65K (Sema3A-65K Δ 3) analysiert. Bei Sema3A-65K Δ 3 handelt es sich um die Deletion der Aminosäurereste 204 – 210, welche sich in der dritten Schleife der Semaphorin Struktur und damit innerhalb der potentiellen Plexin-Bindungsstelle befindet.

Der COS-7 Kollaps-Assay erfolgte zusammen mit der Bestimmung der biologischen Aktivität von Sema3A-65K Δ 1 und Sema3A-65K Δ 2 (siehe 3.1.3). Nach Zugabe von 300 μ g/ml Sema3A-65K Δ 3 zu transfizierten COS-7 Zellen kollabierten $25,6 \pm 1,3\%$ der Plexin-A1 positiven Zellen im Vergleich zu $27,3 \pm 1,3\%$ nach Zugabe von Kontrollmedium ohne Sema3A (Abb. 17). Diese Sema3A-Deletionsmutante zeigte also ebenfalls keine Aktivität im COS-7 Kollaps-Assay.

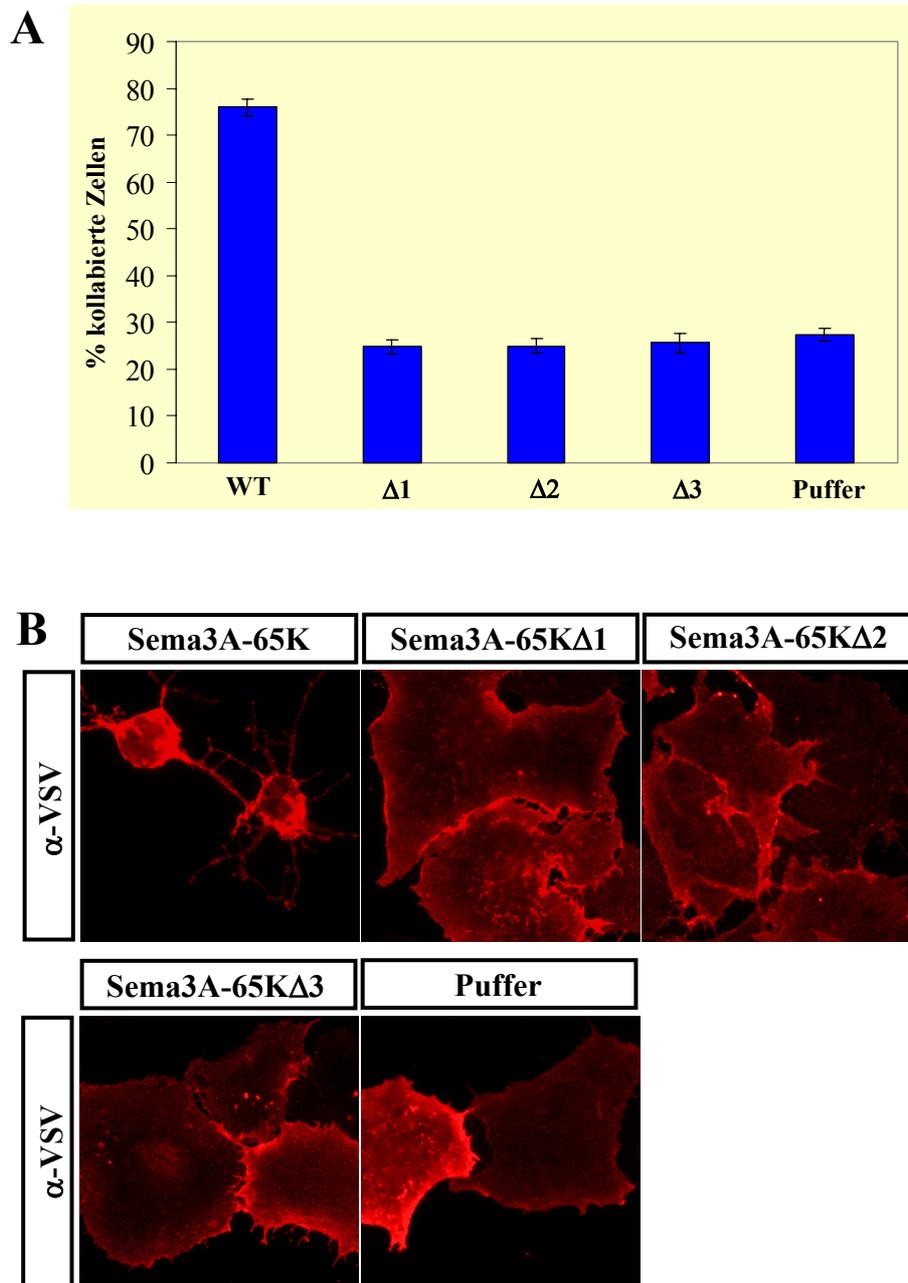


Abb. 17: Deletionsmutanten von Sema3A-65K zeigen keine Aktivität im COS-7 Kollaps-Assay. (A und B) COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1 und HA-Nrp-1 transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit 300µg/ml Sema3A-65K, Sema3A-65KΔ1, Sema3A-65KΔ2, Sema3A-65KΔ3 in Medium oder als Negativkontrolle mit Resuspensions-Puffer in Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Expression von Plexin-A1 mittels eines α-VSV Antikörpers als primären und eines α-Maus-Alexa594 Antikörpers als sekundären Antikörper detektiert und der Anteil der kollabierten, transfizierten Zellen bestimmt (n = 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 x 300 Zellen).

Um auszuschließen, dass der Verlust der kollabierenden Wirkung von Sema3A-65KΔ3 durch eine Beeinträchtigung der Interaktion mit Nrp-1 zustande kommt, wurde die Bindung der Deletionsmutante an Nrp-1 mit der von Sema3A WT verglichen. Hierzu wurde die Deletion in einen Expressionsvektor für ein Fusionsprotein des vollständigen Sema3A Konstruktes mit

der alkalischen Phosphatase (AP) eingeführt. Durch Fusion mit der AP ist es möglich, die Bindung durch eine Farbreaktion einfach zu quantifizieren und damit die Konzentration und Bindungseigenschaften von Sema3A zu messen.

HEK 293T Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für AP-Sema3A und AP-Sema3A Δ 3 transfiziert, nach 48 Stunden Kultur in serumfreiem Medium die sekretierten Proteine geerntet und durch einen AP-Assay die Konzentration der AP-Fusionsproteine bestimmt. Bei diesem Assay wird ein Substrat zugegeben, dessen Umsetzung durch die alkalische Phosphatase zur Bildung eines Produktes führt, dessen Konzentration bei 405 nm gemessen werden kann. Damit lässt sich die Konzentration von Sema3A bestimmen. Für die folgenden Bindungsstudien mit Nrp-1 wurden exakt die gleichen Konzentrationen von AP-Sema3A und AP-Sema3A Δ 3 eingesetzt.

Um die Bindungseigenschaften der Sema3A Mutante zu testen, wurden COS-7 Zellen mit dem Expressionsvektor für HA-Nrp-1 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit AP-Sema3A oder AP-Sema3A Δ 3 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und bei Raumtemperatur mit Substratlösung inkubiert, bis unter dem Lichtmikroskop eine deutliche Färbung zu erkennen war.

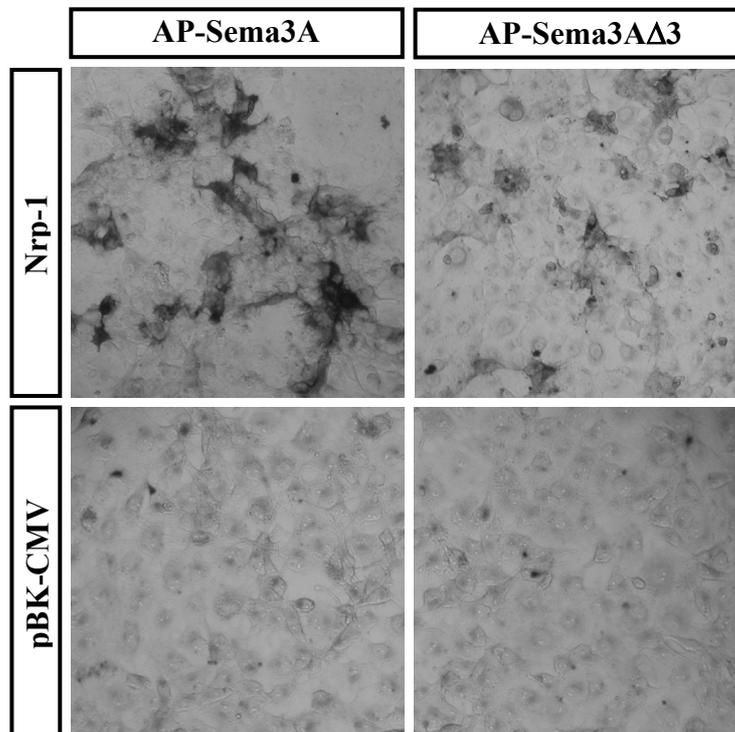


Abb. 18: AP-Sema3A Δ 3 bindet Nrp-1 mit geringerer Affinität als WT Sema3A. COS-7 Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für HA-Nrp-1 oder als Negativkontrolle mit pBK-CMV transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 1 U AP-Sema3A oder AP-Sema3A Δ 3 inkubiert. Eine relative AP-Einheit (1 U AP) entspricht einer Konzentration mit einer OD₄₀₅ von 1,0 im AP-Assay. Die Zellen wurden fixiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Substratlösung für die alkalische Phosphatase gefärbt.

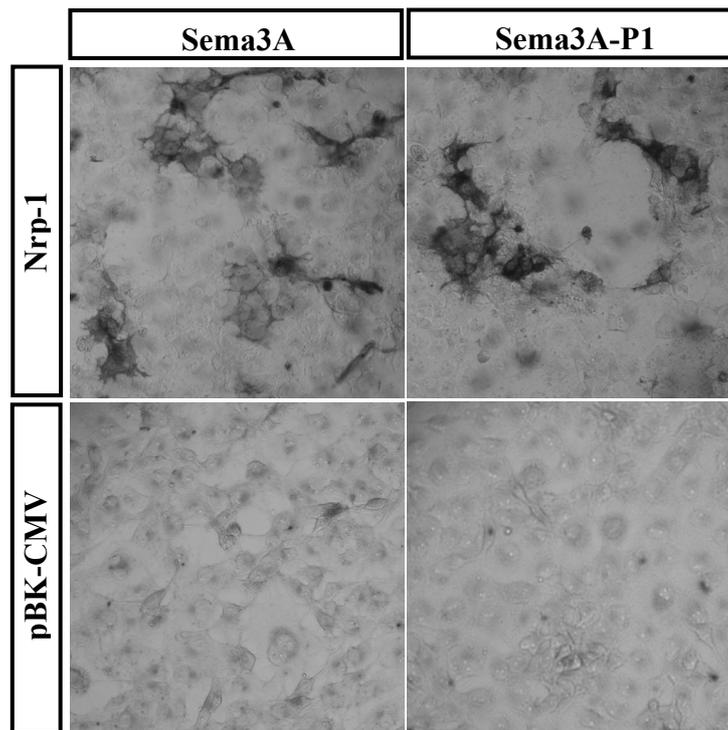


Abb. 20: Sema3A-P1 bindet Nrp-1 mit ähnlicher Affinität wie WT Sema3A. COS-7 Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für HA-Nrp-1 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 1 U AP-Sema3A oder AP-Sema3A-P1 inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Substratlösung für die alkalische Phosphatase inkubiert.

Der Nrp-1 Bindungs-Assay von Sema3A-P1 wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie für Sema3A Δ 3 beschrieben. AP-Sema3A oder AP-Sema3A-P1 zeigten eine vergleichbare Färbung (Abb. 20). Dies deutet darauf hin, dass beide eine ähnliche Affinität für Nrp-1 haben. Da dieser Assay jedoch für eine quantitative Bestimmung der Bindungsaffinitäten nicht geeignet ist, wurde zusätzlich ein quantitativer Bindungs-Assay durchgeführt. Dazu wurden HEK 293T Zellen mit dem Expressionsvektor für HA-Nrp1 oder als Negativkontrolle mit pBK-CMV transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für 1 Stunde mit verschiedenen Konzentrationen von AP-Sema3A oder AP-Sema3A-P1 bei 37°C inkubiert und die Bindungen quantifiziert (Abb. 21).

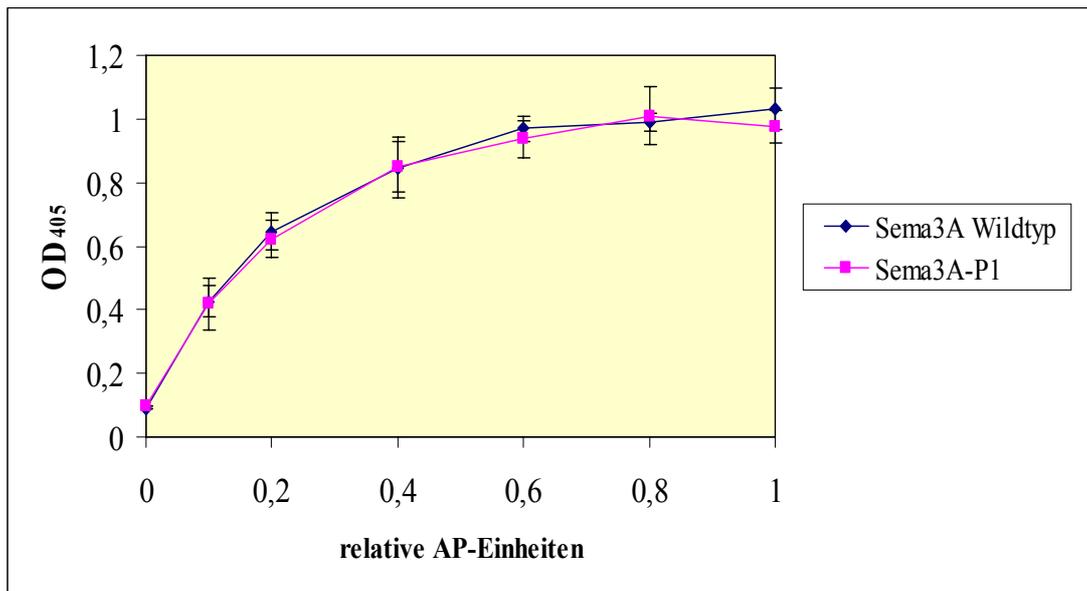


Abb. 21: Sema3A und Sema3A-P1 zeigen gleiche Affinität für Nrp-1. HEK 293T Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für HA-Nrp-1 transfiziert und nach 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Sema3A oder Sema3A-P1 inkubiert. Zur Bestimmung der Menge an gebundenem Sema3A wurden die Zellen lysiert, die Lysate 2 Stunden mit der Substratlösung für die alkalische Phosphatase inkubiert und die optische Dichte bei 405nm bestimmt.

Für beide Proteine ergaben sich sehr ähnliche Bindungskurven (Abb. 21). Somit konnte gezeigt werden, dass Sema3A WT und Sema3A-P1 die gleiche Affinität für Nrp-1 besitzen.

Da die Dimerisierung von Sema3A für die volle Aktivität nötig ist (Klostermann et al., 1998; Koppel and Raper, 1998), wurde weiter untersucht, ob die Mutation die Dimerisierung beeinflusst. Dafür wurden Flag-AP-Sema3A und Flag-AP-Sema3A-P1 im SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im Western-Blot mit einem α -Flag Antikörper detektiert. In der Western-Blot-Analyse konnten bei beiden AP-Sema3A Proteinen Banden des gleichen Molekulargewichtes detektiert werden (Abb. 22). Sema3A hat ein Molekulargewicht von 95 kDa und AP eins von 55 kDa. Eine 300 kDa Bande entsteht durch die Dimerisierung der AP-Sema3A Monomere. Diese Bande ist in beiden Fällen stärker als die der Monomere mit einer Größe von 150 kDa. Damit konnte gezeigt werden, dass Sema3A-P1 in gleicher Weise dimerisiert wie Sema3A Wildtyp.

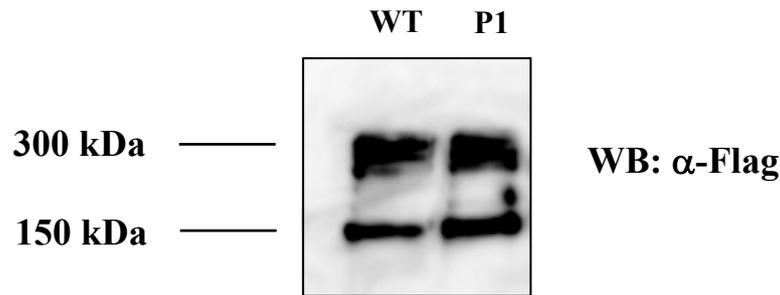


Abb. 22: Dimerbildung von Sema3A-P1. WT Sema3A und Sema3A-P1 wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot mit einem α -Flag Antikörper als primären und einem α -Maus-HRP Antikörper als sekundären Antikörper detektiert.

Da gezeigt wurde, dass Sema3A-P1 die gleiche Affinität für Nrp-1 besitzt wie WT Sema3A und die Dimerisierung nicht beeinträchtigt ist, sollte die Auswirkung der Mutation in der potentiellen Plexin-Bindungsstelle auf die Aktivität von Sema3A im COS-7 Kollaps-Assay weiter untersucht werden.

COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1 und HA-Nrp-1 transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit den gleichen Konzentrationen von Sema3A WT und Sema3A-P1 inkubiert. Anschließend wurde die Expression von Plexin-A1 durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen und der Anteil kollabierter, transfizierter Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Mutation in der potentiellen Plexin-Bindungsstelle eine verringerte Aktivität zur Folge hat (Abb. 23). Bei Inkubation mit Sema3A-P1 kollabierten $42 \pm 2,8$ % der Plexin-A1-positiven Zellen im Gegensatz zu einem fast doppelt so hohen Anteil kollabierter Zellen nach Sema3A Behandlung ($82 \pm 3,1$ %). Dadurch wird die Hypothese bestätigt, dass die Aminosäurereste 207 – 209 der Semaphorin-Domäne von Sema3A für die Aktivierung des Rezeptors wichtig sind und an einer direkten Interaktion mit Plexin beteiligt sein könnten.

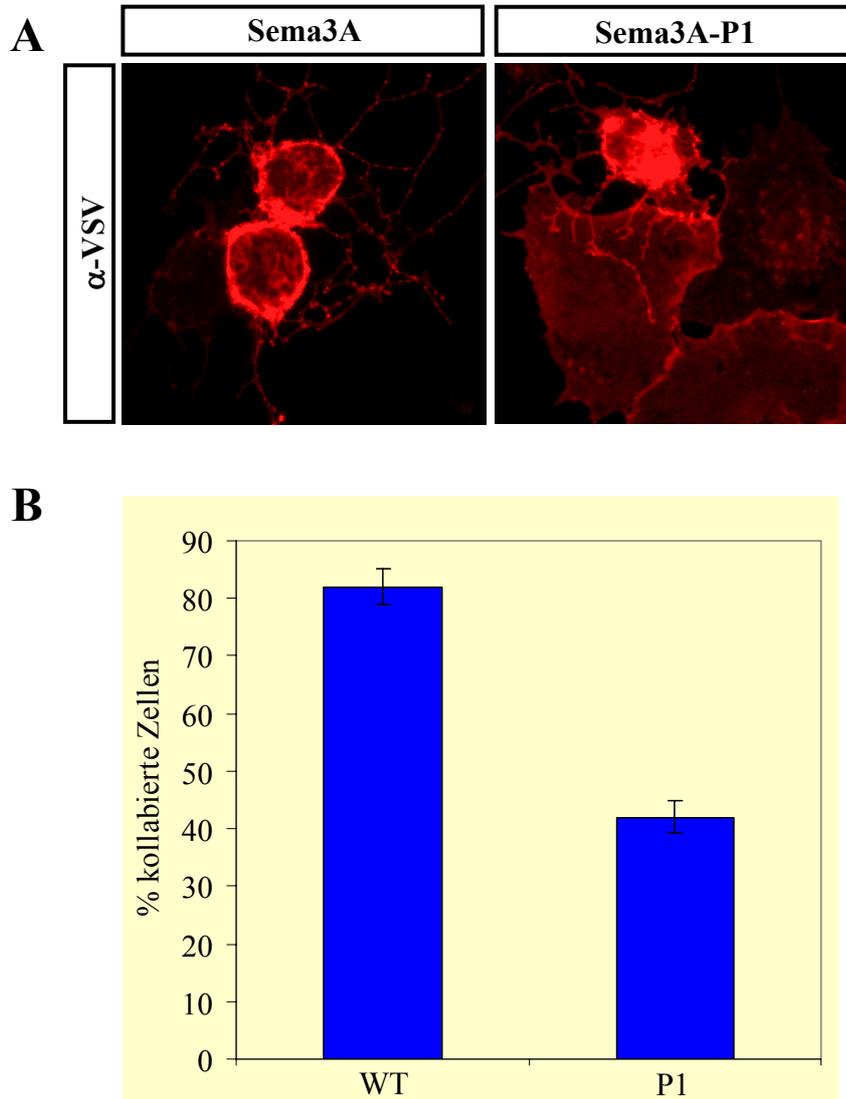


Abb. 23: Sema3A-P1 zeigt verringerte Aktivität im COS-7 Kollaps-Assay. (A und B) COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1 und HA-Nrp-1 transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit 1 U Sema3A oder Sema3A-P1 inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und die Expression von Plexin-A1 mittels eines α -VSV Antikörpers als primären und eines α -Maus-Alexa594 Antikörpers als sekundären Antikörper detektiert. Der Anteil der kollabierten, Plexin-A1-positiven Zellen wurde bestimmt (n = 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 x 300 Zellen).

3.2 Analyse der Sema3A-induzierten Signalkaskade

Nach Bindung von Sema3A an seinen Rezeptor wird durch die zytoplasmatische Domäne der Rezeptoruntereinheit Plexin-A1 eine Signalkaskade aktiviert, die das Zytoskelett, Endozytose und Integrin-Affinität reguliert. Es sind verschiedene Proteine bekannt, die mit Plexin-A1 interagieren und an dieser Signalkaskade beteiligt sind, jedoch sind das Zusammenspiel und die Funktion der einzelnen Effektormoleküle noch weitgehend unbekannt. Die GTPasen RhoD und Rnd1 interagieren beide mit der zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1, zeigen allerdings antagonistische Effekte. Während Rnd1 einen Plexin-A1 vermittelten Zellkollaps induziert, wird dieser durch RhoD blockiert (Zanata et al., 2002). Die genaue Funktion von RhoD in dem von Sema3A aktivierten Signalweg ist noch unklar und sollte in dieser Arbeit weiter analysiert werden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob GTPasen von Plexin-A1 durch eine potentielle GAP-Aktivität reguliert werden.

3.2.1 Etablierung einer Sema3A-sensitiven Zelllinie

Als Modellsystem für den Kollaps von Wachstumskegeln nach Zugabe von Sema3A hat sich der COS Kollaps-Assay bewährt. Da COS-7 Zellen allerdings keinen Rezeptor für Sema3A exprimieren, müssen die Zellen jeweils mit dem Expressionsvektor für Nrp-1 und Plexin-A1 transfiziert werden. Dadurch entsteht eine heterogene Population von Zellen, die nur zum Teil für Sema3A sensitiv sind. Für biochemische Analysen ist der Anteil transfizierter Zellen oft zu gering. Aus diesen Gründen wurde getestet, ob die Neuroblastom-Zelllinie Shep-SF (Ross et al., 1983) Sema3A-Rezeptoren exprimiert und einen deutlichen morphologischen Effekt nach der Zugabe von Sema3A zeigt.

Nach 1 Stunde Inkubation mit Sema3A bei 37°C zeigte sich ein deutlicher morphologischer Effekt, der durch einen kontrahierten Zellkörper und filopodienartige Ausläufer gekennzeichnet ist (Abb. 24). Dieser Effekt ist dem von COS-7 Zellen nach Behandlung mit Sema3A sehr ähnlich. Um die Effekte der Sema3A Behandlung auf das Zytoskelett näher zu untersuchen, wurden nach der Inkubation mit Sema3A die Mikrotubuli und Aktinfilamente durch indirekte Immunfluoreszenz gefärbt (Abb. 25).



Abb. 24: Der Shep-SF Kollaps-Assay. Shep-SF Zellen wurden 1 Stunde mit Sema3A oder mit Kontrollmedium behandelt. Nach Sema3A Behandlung zeigten die Zellen unter dem Lichtmikroskop einen deutlichen morphologischen Effekt, der durch einen kontrahierten Zellkörper und filopodienartige Ausläufer gekennzeichnet ist.

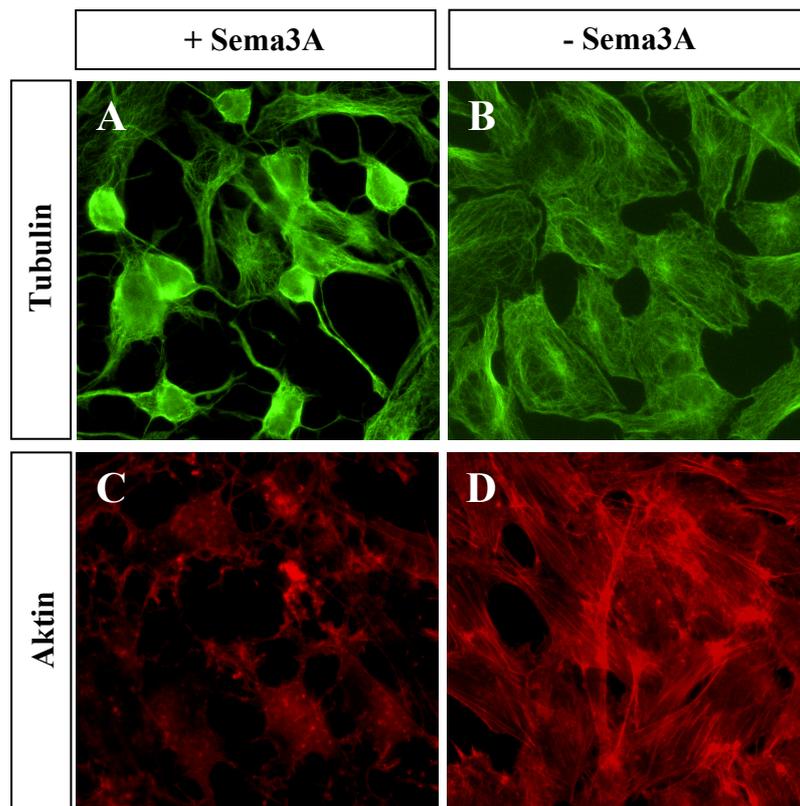


Abb. 25: Färbung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten nach Behandlung mit Sema3A. Shep-SF Zellen wurden 1 Stunde mit Sema3A (A, C) oder mit Kontrollmedium inkubiert (B, D) und anschließend fixiert. (A, B) Die Mikrotubuli wurden durch einen α -Tubulin Antikörper als primären und einem α -Maus-Alexa488 Antikörper als sekundären Antikörper gefärbt. Die Mikrotubuli zeigten keine verstärkte Depolymerisierung nach Sema3A Zugabe. (C, D) Die Aktinfilamente wurden durch Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin detektiert. Diese zeigten eine starke Depolymerisierung nach Sema3A Behandlung.

Nach Sema3A Behandlung war keine sichtbare Veränderung der Mikrotubuli in den kollabierten Zellen im Vergleich zu mit Kontrollmedium behandelten Zellen zu beobachten. (Abb. 25A und B). Die Aktinfilamente hingegen zeigten eine starke Veränderung nach Zugabe von Sema3A (Abb. 25C und D). Während die mit Kontrollmedium inkubierten Zellen sichtbare Aktin-Stressfasern zeigten, waren diese nach Sema3A Zugabe kaum noch sichtbar. Die Färbung von Aktinfilamenten war in den Sema3A behandelten Zellen wesentlich schwächer und zeigte eine punktförmige Verteilung des Aktins in der Zelle. Sema3A führt in Shep-SF Zellen also ähnlich wie in COS-7 Zellen zu einer starken Depolymerisierung der Aktinfilamente, die der Grund für den kollabierten Zellkörper ist.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Shep-SF Zellen für die Analyse des Sema3A-induzierten Kollaps sehr gut geeignet sind und als Modellsystem für den Kollaps von Wachstumskegeln dienen können. Die Zellen sind sehr gut zu kultivieren, exprimieren endogen den Rezeptor für Sema3A und zeigen einen starken morphologischen Effekt nach Zugabe von Sema3A. In dieser Arbeit wurden Shep-SF Zellen verwendet, um mögliche Aktivitätsänderungen von RhoD nach Zugabe von Sema3A zu untersuchen.

3.2.2 Analyse der Funktion von RhoD

Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, wie RhoD den von Sema3A induzierten Kollaps inhibieren könnte. So ist z.B. möglich, dass die Interaktion von RhoD mit Plexin-A1 eine Konformationsänderung von Plexin-A1 bewirkt und somit die Effekte von Sema3A inhibiert. Alternativ könnte RhoD den Zellkollaps durch Interaktion mit einem anderen Effektormolekül blockieren. Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob die Interaktion von RhoD mit Plexin-A1 für die Inhibition des von Sema3A induzierten Kollaps verantwortlich ist. Hierfür wurden vier RhoD Mutanten hinsichtlich ihrer Interaktion mit Plexin-A1 und ihrer Effekte im COS-7 Kollaps-Assay analysiert. Die Proteine tragen jeweils eine Mutation in der Region, über die RhoD mit anderen Effektormolekülen interagiert („Effektor loop“; Abb. 26). Zunächst wurde die Interaktion der RhoD Mutanten mit Plexin-A1 mittels eines „Pulldown“-Assays getestet. Dazu wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen in den pGEX-4T-2 Vektor kloniert und die RhoD Mutanten in *E.coli* M15 Zellen als GST-Fusionsprotein exprimiert. Für den „Pulldown“-Assay wurden die GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit dem Zelllysät von zuvor mit dem Expressionsvektor für VSV-Plexin-A1 transfizierten HEK 293T Zellen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und die Interaktion durch einen Western-Blot überprüft (Abb. 27).

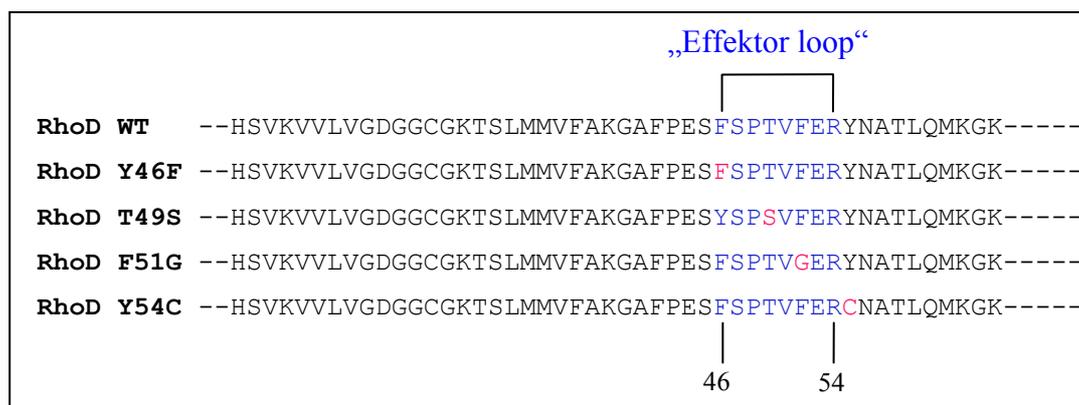


Abb. 26: „Effektor loop“ Mutanten von RhoD. Die Sequenz des „Effektor loops“ der RhoD Mutanten ist blau und die ausgetauschten Aminosäuren rot markiert.

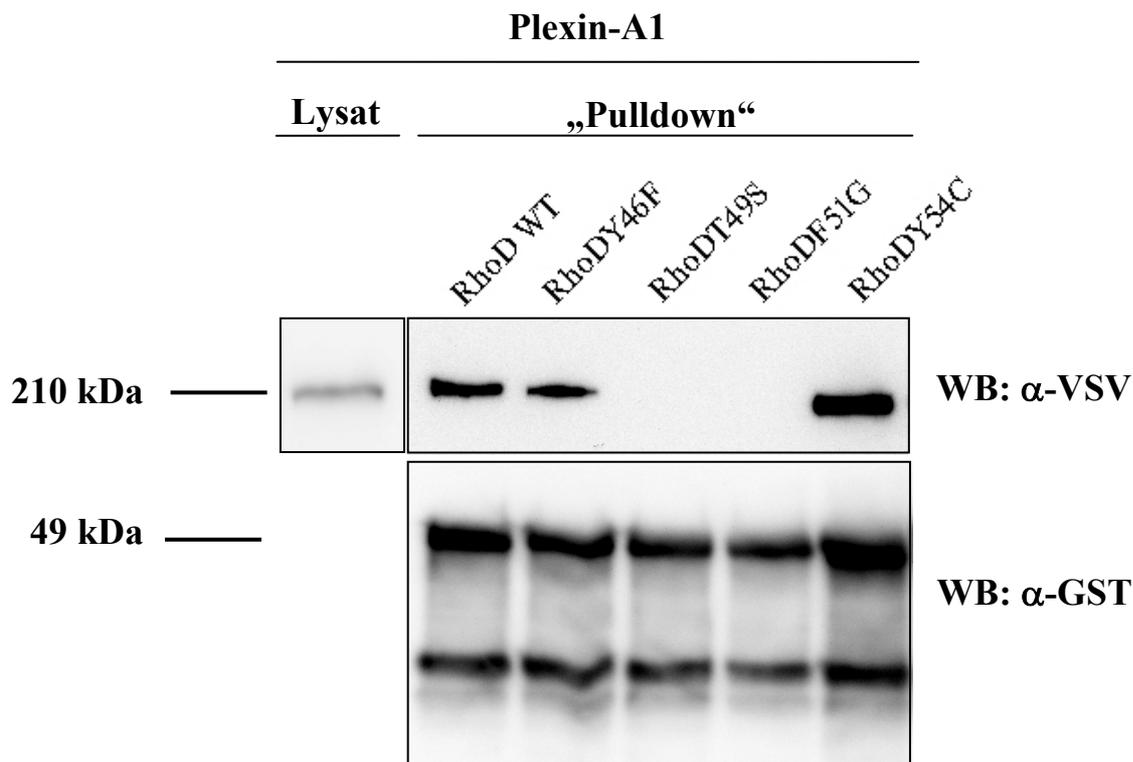


Abb. 27: Interaktion der RhoD „Effektor loop“ Mutanten mit Plexin-A1 im „Pulldown“-Assay. Die RhoD Mutanten wurden als GST-Fusionsprotein in *E.coli* M15 Zellen exprimiert, an Glutathion-Sepharose gebunden und mit dem Lysat von mit dem Expressionsvektor für VSV-Plexin-A1 transfizierten HEK 293T Zellen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert. VSV-Plexin-A1 wurde mittels Western-Blot mit einem α -VSV Antikörper als primären und einem α -Maus-HRP Antikörper als sekundären Antikörper detektiert (Molekulargewicht = 210 kDa). RhoD WT, RhoDY46F und RhoDY54C zeigten eine Interaktion mit Plexin-A1, während RhoDT49S und RhoDF51G nicht mit Plexin-A1 interagierten. Als Kontrolle für die Expression der GST-Fusionsproteine wurden diese im Western-Blot mit einem α -GST Antikörper als primären und einem α -Ziege-HRP Antikörper als sekundären Antikörper detektiert (Molekulargewicht = 49 kDa).

Von den 4 „Effektor loop“ Mutanten interagierten nur RhoDY46F und RhoDY54C mit Plexin-A1. Als Positivkontrolle diente WT RhoD (Abb. 27). Weiterhin wurde getestet, ob die RhoD Mutanten ähnlich wie WT RhoD den Sema3A-induzierten Zellkollaps inhibieren können. Dazu wurden COS-7 Zellen mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1, HA-Nrp-1 und das GFP-Fusionsprotein der jeweiligen RhoD-Mutante transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit Sema3A inkubiert. Anschließend wurde die Expression von Plexin-A1 durch indirekte Immunfluoreszenz und die Expression von RhoD durch die GFP-Fluoreszenz nachgewiesen und der Anteil der kollabierten, Plexin-A1 und RhoD-positiven Zellen bestimmt. Als Positivkontrolle diente GFP-RhoD WT und als Negativkontrolle GFP (Abb. 28).

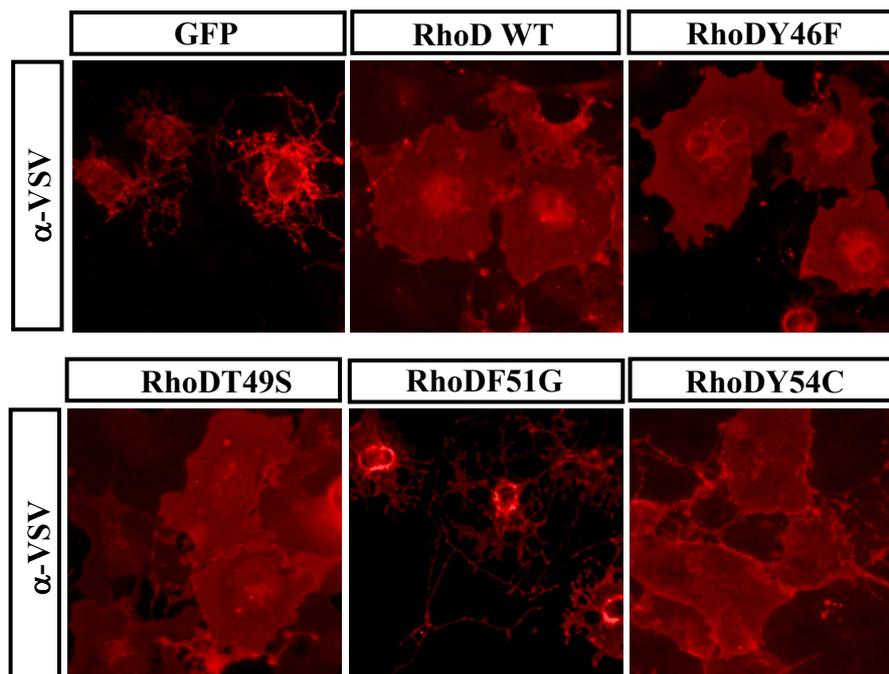
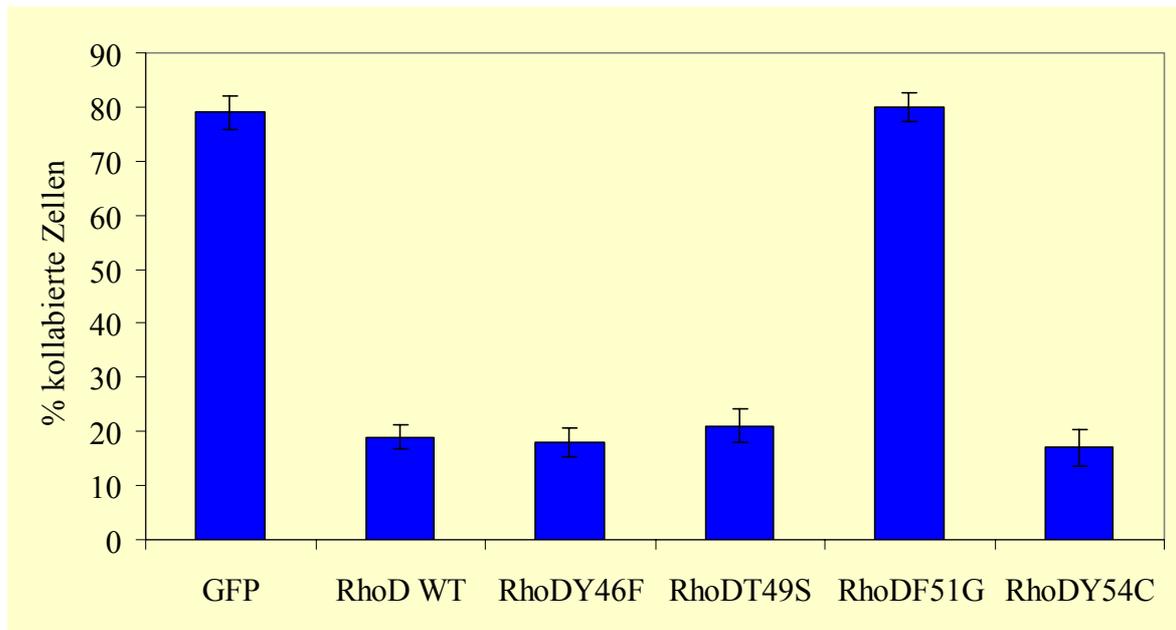


Abb. 28: Analyse der „Effektor loop“ Mutanten von RhoD im COS-7 Kollaps-Assay. COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1, HA-Nrp-1 und das GFP-Fusionsprotein der jeweiligen RhoD Mutante transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit Sema3A inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Expression von Plexin-A1 mittels eines α -VSV Antikörpers als primären und eines α -Maus-Alexa594 Antikörpers als sekundären Antikörper nachgewiesen. Die Expression von RhoD wurde mittels der GFP-Fluoreszenz detektiert. Der Anteil der kollabierten, Plexin-A1 und RhoD-positiven Zellen wurde bestimmt (n = 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 x 300 Zellen). Nur die Mutante RhoDF51G konnte den Kollaps nicht blockieren.

Im COS-7 Kollaps-Assay zeigten RhoD Y46F und RhoD Y54C, die beide im „Pulldown-Assay“ mit Plexin-A1 interagierten, den gleichen Effekt wie WT RhoD, nämlich die Inhibition des Sema3A-induzierten Kollaps. RhoDT49S und RhoDF51G, die im „Pulldown-Assay“ nicht mit Plexin-A1 interagierten, zeigten hingegen unterschiedliche Effekte (Abb. 28). Während RhoDT49S den Kollaps blockierte ($21 \pm 3,1\%$ kollabierte Zellen), zeigte RhoDF51G keinen inhibitorischen Effekt ($80 \pm 2,6\%$ kollabierte Zellen). Damit konnte gezeigt werden, dass RhoD nicht mit Plexin-A1 interagieren muss, um den durch Sema3A induzierten Zellkollaps zu blockieren.

Durch diese Ergebnisse wurde die Hypothese gestärkt, dass RhoD den Zellkollaps durch die Interaktion mit einem anderen Effektormolekül inhibiert. Neben Plexin-A1 ist humanes Diaphanous2C (hDia2C) als Interaktionspartner für RhoD bekannt. RhoD interagiert mit hDia2C über dessen GTPase-Bindedomäne und entlässt Dia2C damit aus einer autoinhibierten Konformation. Durch die Interaktion mit RhoD wird hDia2C an Endosomen rekrutiert und inhibiert dort deren Motilität (Gasman et al., 2003).

Um einen Zusammenhang zwischen der Inhibition der Effekte von Sema3A und der Interaktion von RhoD mit hDia2C zu bestätigen, wurde die Interaktion der RhoD Mutanten mit hDia2C in einem „Pulldown“-Assay untersucht. Die GTPase-Bindedomäne von hDia2C (hDia2C-GBD) wurde in HEK 293T Zellen exprimiert, das Lysat der Zellen mit zuvor an Glutathion-Sepharose gekoppeltem GST-RhoD inkubiert und die Bindung im Western-Blot überprüft (Abb. 29).

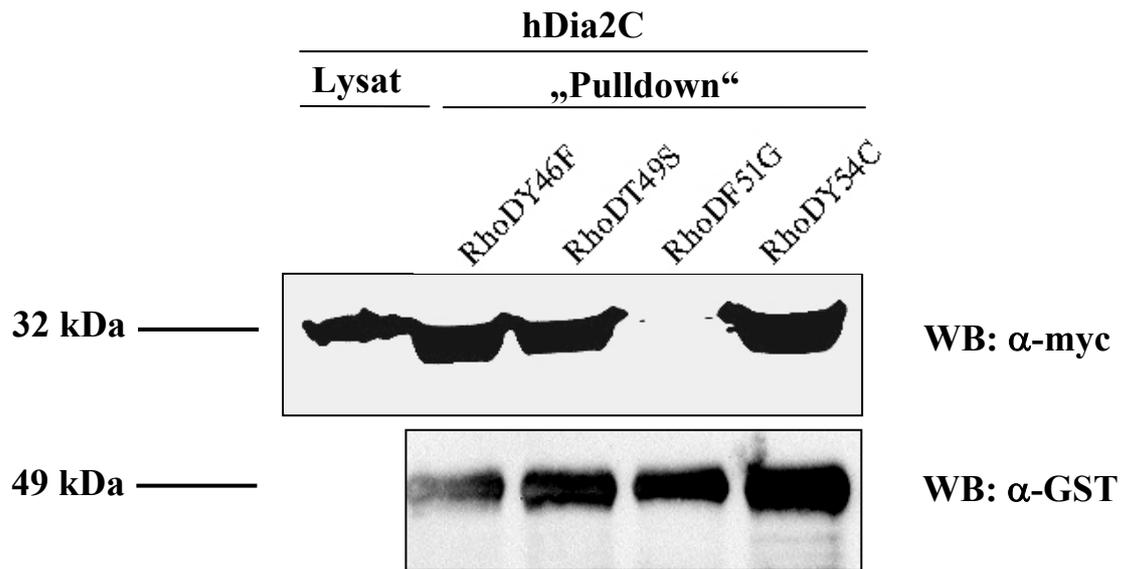


Abb. 29: Interaktion der RhoD Mutanten mit hDia2C im „Pulldown“-Assay. Die RhoD Mutanten wurden als GST-Fusionsprotein in *E.coli* M15 Zellen exprimiert, an Glutathion-Sepharose gebunden und mit dem Lysat von mit dem Expressionsvektor für myc-hDia2C-GBD transfizierten HEK 293T Zellen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert. Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurde hDia2C-GBD mit einem α -myc als primären Antikörper und einem α -Maus-HRP Antikörper als sekundären Antikörper im Western-Blot detektiert (Molekulargewicht = 32 kDa). RhoDY46F, RhoDT49S und RhoDY54C zeigten eine Interaktion mit Dia2C, während RhoDF51G nicht mit hDia2C interagiert. Als Kontrolle für die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Matrix wurden diese im Western-Blot mit einem α -GST Antikörper als primären und einem α -Ziege-HRP Antikörper als sekundären Antikörper detektiert (Molekulargewicht = 49 kDa).

Die RhoD Mutanten, die im COS-7 Kollaps-Assay eine inhibierende Wirkung zeigten (RhoDY46F, RhoDT49S und RhoDY54C), interagierten im „Pulldown-Assay“ auch mit hDia2C. Die RhoD-Mutante, die den Sema3A-induzierten COS-7 Kollaps nicht blockieren konnte (RhoDF51G), zeigte hingegen keine Interaktion mit hDia2C (Abb. 29). Damit konnte gezeigt werden, dass für den inhibitorischen Effekt von RhoD eine Interaktion mit Plexin-A1 nicht notwendig ist, sondern durch die Bindung von hDia2C erklärt werden kann. Deshalb wurde weiter untersucht, ob eine konstitutiv aktive Form von hDia2C (hDia2C Δ GBD, bei der die GTPase-Bindedomäne deletiert ist, und somit die Bildung einer autoinhibierten Konformation verhindert wird), in Abwesenheit von RhoD den Sema3A-induzierten Kollaps inhibiert. Dazu wurden COS-7 Zellen mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1, HA-Nrp-1 und myc-hDia2C oder myc-Dia2C Δ GBD transfiziert und nach 48 Stunden für 1 Stunde bei 37°C mit Sema3A oder Kontrollmedium inkubiert. Die Expression von Plexin-A1 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen und der Anteil der kollabierten, Plexin-A1-positiven Zellen bestimmt.

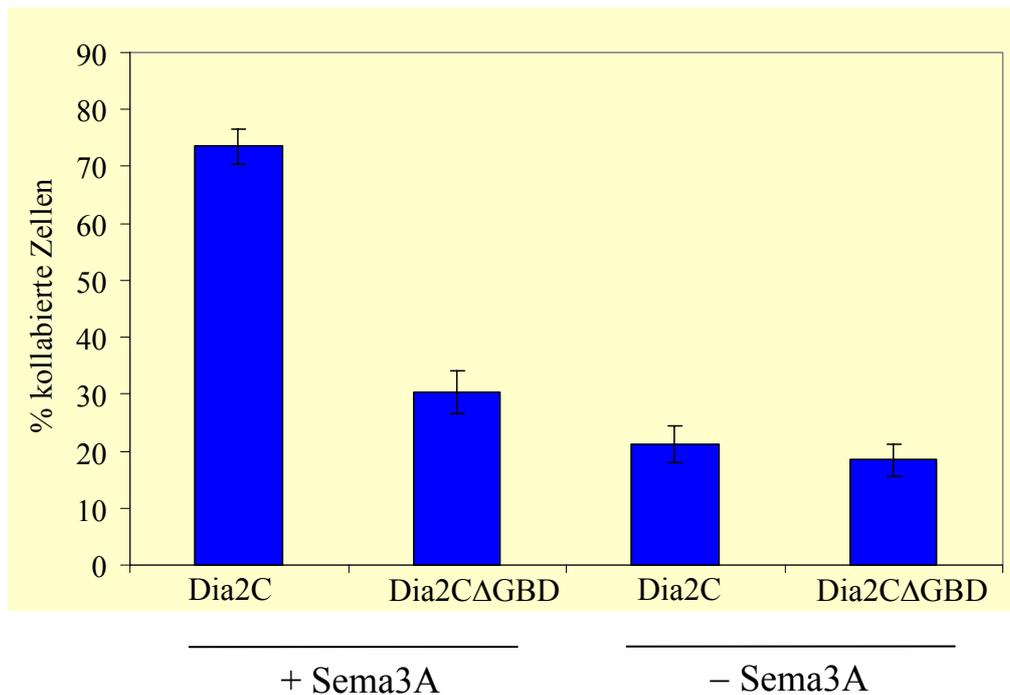


Abb. 30: Konstitutiv aktives Dia2C inhibiert den Sema3A-induzierten Zellkollaps. COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1, HA-Nrp-1 und Dia2C oder Dia2CΔGBD transfiziert und 1 Stunde bei 37°C mit Sema3A oder Kontrollmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Expression von Plexin-A1 mittels eines α -VSV als primären und eines α -Maus-Alexa594 als sekundären Antikörper detektiert. Der Anteil der kollabierten, Plexin-A1-positiven Zellen wurde bestimmt (n = 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 x 300 Zellen).

Konstitutiv aktives hDia2C inhibierte den Kollaps der Zellen (Abb. 30). Bei der Koexpression von Plexin-A1, Nrp-1 und Dia2CΔGBD kollabierten lediglich $30,4 \pm 3,8\%$ der Plexin-A1-positiven Zellen nach Sema3A Zugabe. Dagegen kollabierten bei Koexpression von Plexin-A1, Nrp-1 und hDia2C $73,6 \pm 3,1\%$ der Plexin-A1-positiven Zellen. Bei Zugabe von Kontrollmedium kollabierten bei Expression von hDia2C und hDia2C-ΔGBD $21,3 \pm 3,2\%$ bzw. $18,5 \pm 2,8\%$. Diese Ergebnisse zeigen, dass aktives hDia2C in ähnlicher Weise den Zellkollaps inhibieren kann wie RhoD. Da hDia2C durch RhoD aktiviert wird, ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion von RhoD mit hDia2C für die Inhibition des von Sema3A induzierten Zellkollaps verantwortlich ist. Daher stellte sich die Frage, welche Funktion die Interaktion von RhoD mit Plexin-A1 hat. Es ist denkbar, dass durch die Interaktion mit Plexin-A1 die Aktivität von RhoD verändert wird. Bisher gab es keinen etablierten Assay, mit dem die Aktivität von RhoD gemessen werden konnte. Um in einem „Pulldown“-Assay die Menge an GTP-gebundenem RhoD bestimmen zu können, wurde die GTPase-Bindedomäne von Dia2C (hDia2C-GBD) in den pGEX-5X-3 Vektor kloniert und in *E.coli* M15 Zellen als GST-Fusionsprotein exprimiert. Zur Kontrolle der Expression wurde

das Fusionsprotein durch Glutathion-Sepharose gereinigt und nach SDS-PAGE durch eine Coomassie-Färbung nachgewiesen (Abb. 31).

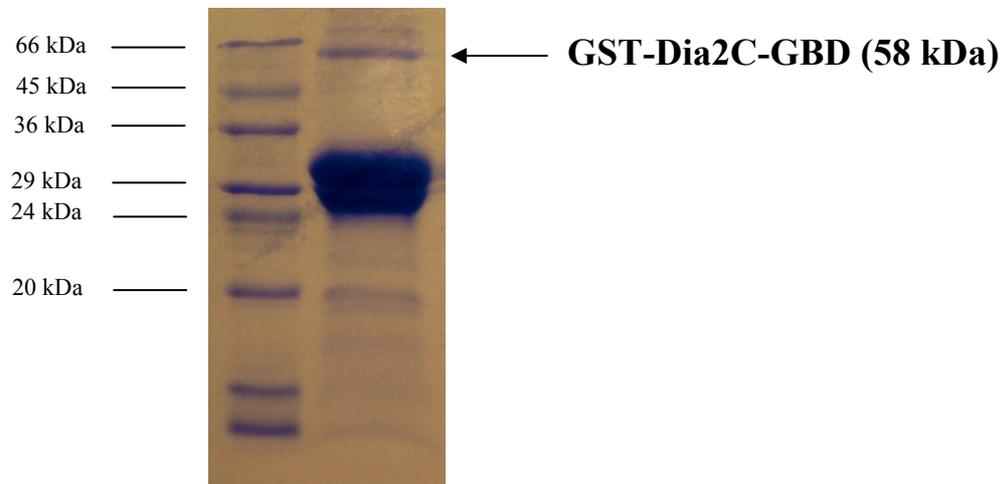


Abb. 31: Expression von GST-Dia2C-GBD. Die Expression von GST-Dia2C-GBD wurde 16 Stunden bei 20°C in Anwesenheit von 0,1 mM IPTG in *E.coli* M15 Zellen induziert. Die Zellen wurden lysiert und das Fusionsprotein durch Glutathion-Sepharose gereinigt. Das gebundene Protein wurde eluiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Durch eine Coomassie-Färbung wurden die Proteine nachgewiesen.

Da im Verhältnis zum Gesamtprotein nur eine schwache Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 58 kDa des kompletten Fusionsproteins nachweisbar war, ist anzunehmen, dass das Fusionsprotein in Bakterien proteolytisch gespalten wird (Abb. 31). Deshalb wurde zunächst getestet, ob das Fusionsprotein für einen „Pull-down“-Assay, bei dem selektiv aktives RhoD gebunden wird, geeignet ist. Dazu wurde GST-Dia2C-GBD an Glutathion-Sepharose gebunden und mit dem Lysat von zuvor mit den Expressionsvektoren für GFP-RhoD oder dominant negatives GFP-RhoDN31 transfizierten HEK 293T Zellen inkubiert. Die eluierten Proteine wurden nach der Auftrennung im SDS-Gel mittels Western-Blot analysiert (Abb. 32).

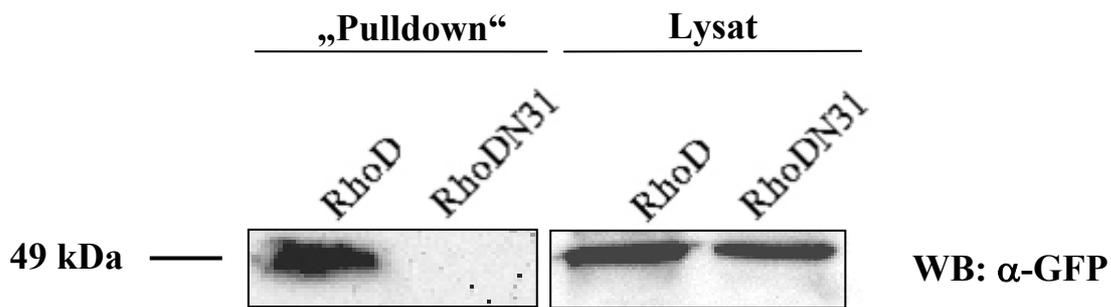


Abb. 32: GTP-gebundenes RhoD interagiert mit hDia2C. GST-hDia2C-GBD wurde in *E.coli* M15 Zellen exprimiert, an Glutathion-Sepharose gebunden und mit dem Lysat von GFP-RhoD oder GFP-RhoDN31 transfizierten HEK 293T Zellen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde RhoD mit einem α -GFP Antikörper als primären und einem α -Maus-HRP Antikörper als sekundären Antikörper im Western-Blot detektiert (Molekulargewicht = 49 kDa). Im Gegensatz zu dominant negativem RhoDN31, das nur in GDP-gebundener Form vorliegt, interagierte GTP-gebundenes RhoD mit GST-hDia2C-GBD.

Es konnte gezeigt werden, dass GST-hDia2C-GBD selektiv mit der GTP-gebundenen Form von RhoD interagiert. Es zeigte keine Interaktion mit dominant negativem RhoDN31, das ausschließlich in der GDP-gebundenen Form vorliegt (Abb. 32). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde versucht, mit Hilfe dieses GST-Fusionsproteins Aktivitätsänderungen von endogenem RhoD beim durch Sema3A ausgelösten Kollaps zu messen. Als System für diesen Assay wurde die Neuroblastom-Zelllinie Shep-SF benutzt (siehe 3.2.1). Shep-SF Zellen wurden 0, 10, 20, 30, 40 und 50 Minuten mit bei 37°C mit Sema3A behandelt. Das Lysat der Zellen wurde mit zuvor an Glutathion-Sepharose gebundenem GST-hDia2C-GBD inkubiert. Die Proteine wurden eluiert und nach SDS-PAGE mittels Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle diente an Glutathion gekoppeltes GST-hDia2C-GBD, das nicht mit dem Zelllysate inkubiert wurde (Abb. 33).

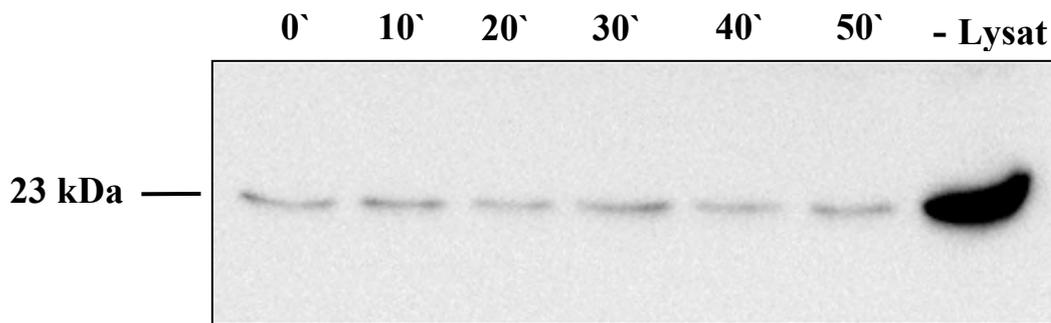


Abb. 33: Bestimmung der Menge von GTP-RhoD während des durch Sema3A ausgelösten Kollaps. Shep-SF Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Sema3A behandelt. Die Lysate der Zellen wurden mit zuvor an Glutathion-Sepharose gebundenem GST-Dia2C-GBD inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert. Nach SDS-PAGE wurde im Western-Blot ein polyklonaler α -RhoD Antikörper als primärer Antikörper und ein α -Kaninchen Antikörper als sekundärer Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle diente an Glutathion-Sepharose gekoppeltes GST-Dia2C-GBD, das nicht mit einem Zelllysate inkubiert wurde (rechte Spur).

Obwohl in der Western-Blot-Analyse in jeder Probe eine Bande zu erkennen war, die dem Molekulargewicht von RhoD entspricht (23 kDa), wurde ebenfalls in der Negativkontrolle eine stärkere Bande des gleichen Molekulargewichtes detektiert (Abb. 33). Da die Negativkontrolle nicht mit dem RhoD enthaltenden Lysat inkubiert wurde, scheinen die Banden unspezifisch zu sein. Eine Aktivitätsänderung von RhoD während des durch Sema3A ausgelösten Kollaps von Shep-SF Zellen konnte daher nicht gemessen werden.

3.2.3 Analyse der potentiellen GAP-Aktivität von Plexin-A1

Die Sequenz der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 zeigt Homologie zu RasGAPs. Die homologen Regionen besitzen zwei für die Funktion von Plexin-A1 essentielle Arginin-Reste, die den für die katalytische Aktivität notwendigen Arginin-Resten der GAPs entsprechen. Für Plexin-B1 wurde bereits eine für R-Ras spezifische GAP-Aktivität beschrieben, die von der Interaktion mit Rnd1 und der Dimerisierung von Plexin-B1 abhängig ist. Es sollte daher die potentielle GAP-Aktivität von Plexin-A1 untersucht werden.

Die GTP-Hydrolyse von R-Ras und H-Ras wurde in Anwesenheit von Membranfraktionen transfizierter COS-7 Zellen fluoreszenzspektroskopisch mittels einer „Stopped-Flow“-Apparatur gemessen. Die Messung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Ahmadian am MPI in Dortmund (Abteilung für Strukturelle Biologie, Prof. Dr. Wittinghofer).

Es wurden COS-7 Zellen mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1 und GFP-Rnd1, GFP-Rac1 oder HA-Nrp-1 transfiziert. Die Zellen wurden 5 Minuten mit Sema3A behandelt und die Membranfraktionen der Zellen aufgereinigt. Die Expression der Proteine wurde mittels Western-Blot überprüft. Das fluoreszierende GTP-Analog TAMRA-GTP wurde durch Nukleotidaustausch an R-Ras oder H-Ras gebunden. In den Messzellen der „Stopped-Flow“-Apparatur wurden automatisch die Lösungen gemischt, die die TAMRA-GTP gebundene GTPase und die Membranfraktionen enthielten. Das Fluoreszenzsignal wurde für 500 Sekunden aufgenommen. Als Positivkontrolle diente das RasGAP NF1-333 (Abb. 34).

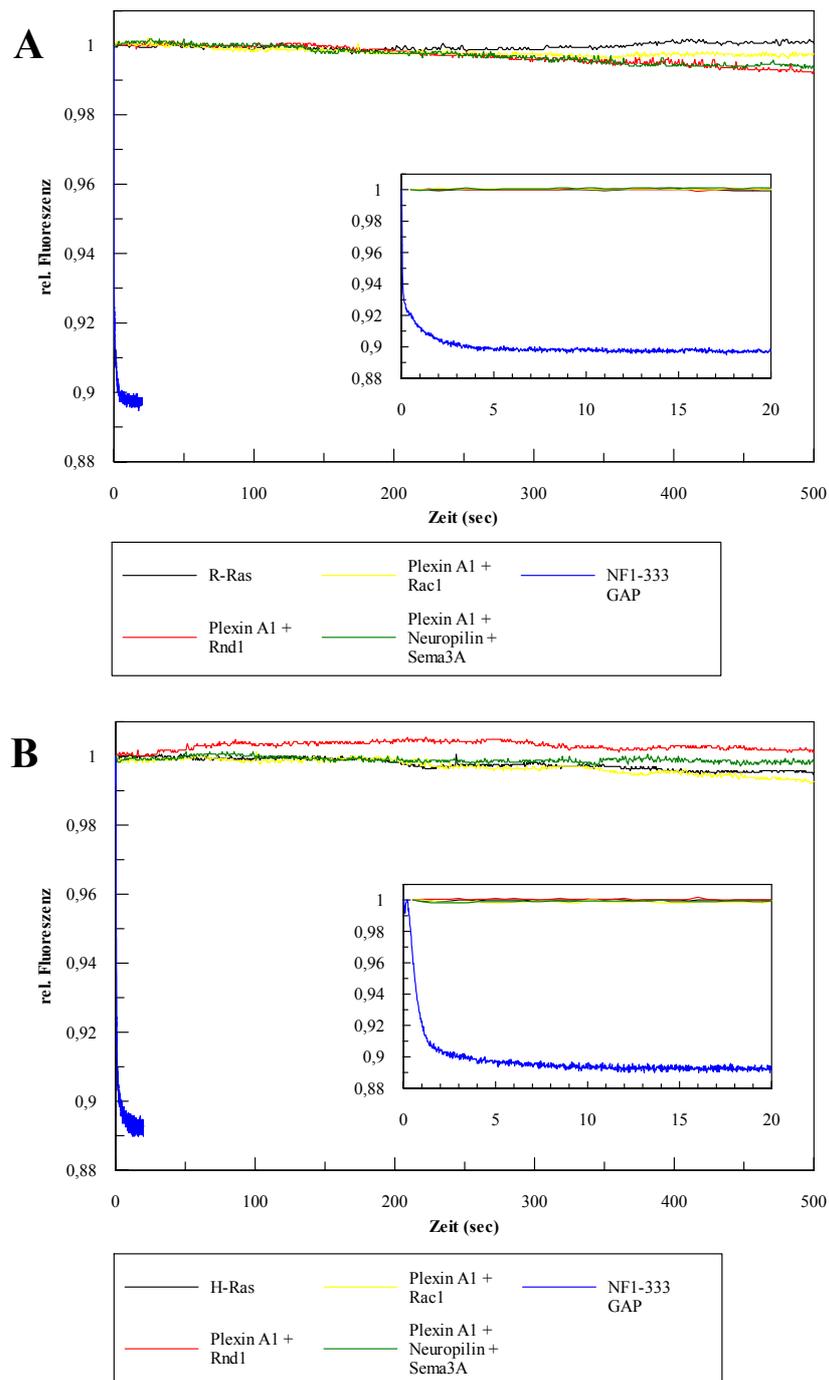


Abb. 34: GTP-Hydrolyse von R-Ras und H-Ras in Anwesenheit von Membranfraktionen transfizierter COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für VSV-Plexin-A1 und Rnd1, Rac1 oder Nrp-1 transfiziert. Die Zellen wurden 5 Minuten mit Sema3A behandelt und die Membranfraktionen isoliert. Die Membranfraktionen wurden in einer „Stopped-Flow“-Apparatur mit (A) TAMRA-GTP gebundenem R-Ras oder (B) TAMRA-GTP gebundenem H-Ras gemischt. Das Fluoreszenzsignal wurde für 500 Sekunden aufgenommen. Die Abnahme des Signals korreliert mit der GTP-Hydrolyse. Als Positivkontrolle diente das RasGAP NF1-333. In den Abbildungen ist ebenfalls verkleinert eine Messung für 20 Sekunden dargestellt (n = 2 unabhängige Versuche mit jeweils 3 Messungen).

In Abwesenheit der Membranfraktionen oder NF1-333 GAP zeigten R-Ras und H-Ras eine sehr langsame intrinsische Hydrolyse von TAMRA-GTP. In Anwesenheit von NF1-333 GAP konnte dagegen eine starke Beschleunigung der Hydrolyse gemessen werden, wobei die Reaktion in weniger als 20 Sekunden abgeschlossen ist. In Anwesenheit der Membranfraktionen zeigten allerdings weder R-Ras noch H-Ras eine Beschleunigung der GTP-Hydrolyse. In diesem Assay konnte also weder für R-Ras noch für H-Ras eine GAP-Aktivität für durch Sema3A, Rnd1 oder Rac1 aktiviertes Plexin-A1 gemessen werden.

4 Diskussion

4.1 Strukturelle und funktionelle Analyse von Sema3A

4.1.1 Kristallstruktur-basierende Analyse von Sema3A

Die Semaphorine sind eine große Proteinfamilie, die zusammen mit den Netrinen, Ephrinen und Slit-Proteinen als essentielle Signalmoleküle für die Navigation von auswachsenden Axonen im Nervensystem fungieren. Alle Semaphorine besitzen am Amino-Terminus eine konservierte Semaphorin-Domäne, die aus ca. 500 Aminosäuren besteht und für ihre Funktion essentiell ist (Review: Fiore und Püschel, 2003). Das sekretierte Sema3A war das erste repulsiv wirkende Protein, das molekular charakterisiert wurde. Der repulsive Effekt wird durch einen Rezeptorkomplex vermittelt, der Nrp-1 als ligandenbindende Untereinheit und ein Typ A Plexin als signaltransduzierende Untereinheit enthält. Zusammen mit den Plexinen und den Rezeptor-Tyrosinkinasen MET und RON bilden die Semaphorine die Semaphorin-Superfamilie. Während Semaphorine und Plexine in Vertebraten und Invertebraten vertreten sind, kommen MET und RON ausschließlich in Vertebraten vor.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Struktur der Semaphorin-Domäne unbekannt. Für eine spätere Kristallstrukturanalyse wurde mittels des COS Kollaps-Assays die biologische Aktivität eines 65 kDa Fragmentes von Sema3A (Sema3A-65K), welches die vollständige Semaphorin-Domäne enthält, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Sema3A-65K wie das vollständige Sema3A eine kollabierende Aktivität hat. Der EC_{50} -Wert der Kollaps-induzierenden Aktivität von Sema3A-65K lag bei 1,9 μ M. Damit ist dieser wesentlich höher als der für das vollständige Protein ($EC_{50} = 0,1$ nM). Für die Aktivität von Sema3A ist die Bildung eines kovalenten Dimers essentiell. Diese Dimerisierung wird durch einen Cystein-Rest an der Position 723 vermittelt, der zwischen der Ig-Domäne und dem carboxy-terminalen basischen Motiv liegt (Klostermann et al., 1998; Koppel and Raper, 1998). Da in Sema3A-65K dieser für die Dimerisierung notwendige Cystein-Rest nicht vorhanden ist, liegt es in einer monomeren und damit weniger aktiven Form vor. Desweiteren potenzieren die in Sema3A-65K deletierte Ig-Domäne und das carboxy-terminale basische Motiv die Aktivität von Sema3A (Koppel et al., 1997). Dies erklärt, weshalb Sema3A-65K einen wesentlich höheren EC_{50} -Wert für seine kollabierende Aktivität besitzt als WT Sema3A.

Die Kristallstrukturanalyse von Sema3A-65K zeigte, dass es sich bei der Semaphorin-Domäne unerwarteter Weise um die Variation einer β -Propeller Struktur handelt, obwohl die

Domäne keine erkennbaren sich wiederholende Sequenzmotive enthält (Antipenko et al., 2003; Fulop and Jones, 1999; Paoli, 2001). Deshalb war im Gegensatz zu anderen Proteinen für die Semaphorin-Domäne keine β -Propeller Struktur vorhersagbar (Springer, 2002). Die Semaphorin-Domäne enthält sieben Schleifen, die um eine zentrale Achse angeordnet sind. Jede einzelne Schleife besteht aus einer β -Faltblattstruktur, die 4 antiparallele β -Faltblätter enthält. Die Semaphorin-Domäne von Sema3A zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Proteinen mit einer β -Propeller-Domäne, wie z.B. der β -Untereinheit des G-Proteins Transducin (Sondek et al., 1996), dem Transkriptionsrepressor Tup1 (Sprague et al., 2000), Arp2/3 (Robinson et al., 2001) und Integrin αv (Xiong et al., 2001).

Im Gegensatz zu anderen β -Propeller-Strukturen, die durch sich wiederholende Sequenzmotive stabilisiert werden, wird die Faltung der Semaphorin-Domäne durch die Disulfidbrücken der konservierten Cystein-Reste stabilisiert. Dadurch wird eine relativ hohe Divergenz in der Primärstruktur der Domäne möglich. Aus dieser Sicht ist die Semaphorin-Domäne der viralen Neuraminidase ähnlich, in deren β -Propeller-Struktur 9 Disulfidbrücken, jedoch keine sich wiederholende Sequenzmotive vorkommen (Paoli, 2001; Varghese et al., 1983).

Nach der Struktur der Semaphorin-Domäne von Sema3A, wurden ebenfalls die Strukturen der Semaphorin-Domäne von Sema4D und MET gelöst (Gherardi et al., 2004; Love et al., 2003; Stamos et al., 2004). Die Semaphorin-Domänen von Sema4D und MET besitzen ebenfalls eine β -Propeller-Struktur mit sieben Schleifen und vier antiparallelen Faltblättern je Schleife und zeigen erwartungsgemäß große strukturelle Ähnlichkeit zu Sema3A. Die Semaphorin-Domäne ist mit ungefähr 500 Aminosäuren die größte bekannte β -Propeller-Struktur. Die meisten anderen β -Propeller enthalten ungefähr 400 Aminosäuren, wie z.B. Integrin αv mit 438 Aminosäuren (Xiong et al., 2001). Die Größe der Semaphorin-Domäne entsteht durch zusätzliche Strukturelemente innerhalb einzelner Schleifen. Während die Faltblätter der Semaphorin-Domäne zwischen Sema3A, Sema4D und MET konserviert sind, zeigen die zusätzlichen Strukturelemente zwischen den Faltblättern große Variabilität. Die größte Insertion variiert von 57 Aminosäuren in MET bis 77 Aminosäuren in Sema4D und ist hinter dem 3. Faltblatt der 5. Schleife lokalisiert. Diese Insertion ist ein spezielles Kennzeichen der Semaphorin-Struktur, die sie von anderen β -Propeller-Strukturen unterscheidet (Abb. 35).

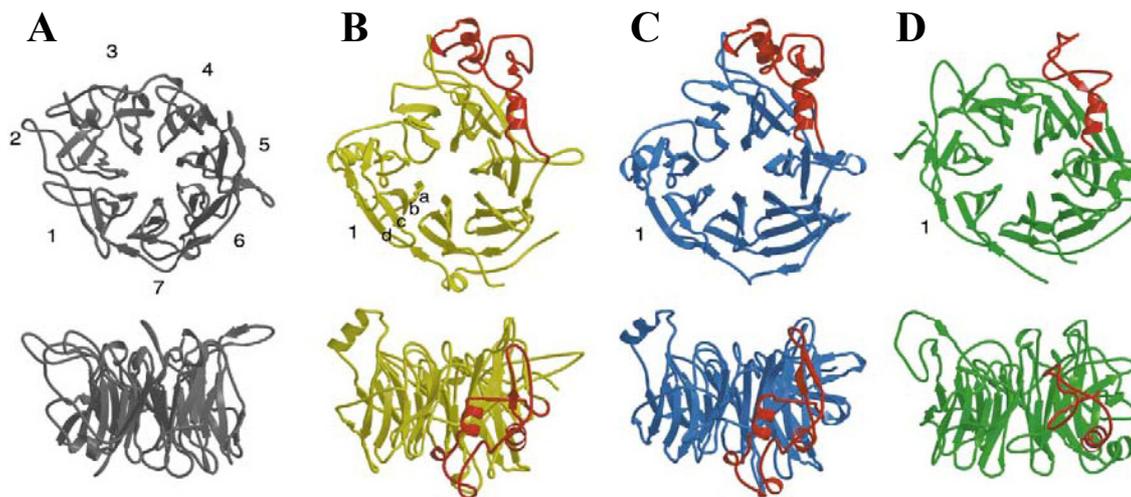


Abb. 35: Verschiedene β -Propeller-Strukturen. Dargestellt sind die β -Propeller-Strukturen von (A) Integrin α V, (B) Sema3A, (C) Sema4D und (D) Met. Die für die Semaphorin-Domäne typischen Insertionen in Schleife 5 sind rot markiert (modifiziert nach Gherardi et al., 2004).

Die Semaphorin-Domänen von Sema3A und Sema4D bilden beide im Kristall und in Lösung ein Dimer, wobei jeweils die 4. und 5. Schleife, inklusive der Insertion in Schleife 5, an der Dimerisierung beteiligt sind. Obwohl die einzelnen interagierenden Aminosäuren nicht zwischen Sema3A und Sema4D identisch sind, scheint die Lokalisation der Dimerisierungsstelle zwischen verschiedenen Semaphorinen konserviert zu sein. Sema3A-65K ist in Lösung ein Dimer, geht aber durch die Bindung von Nrp-1 in einen monomeren Zustand über. Die Bindung des Rezeptors erfolgt demnach mit einer Stöchiometrie von 1:1. Da die 90 kDa Form von Sema3A über eine Disulfidbrücke, die außerhalb der Semaphorin-Domäne liegt (Cystein 723), ein kovalentes Dimer bildet (Klostermann et al., 1998; Koppel and Raper, 1998), bindet dieses Sema3A-Dimer Nrp-1, das ebenfalls ein Dimer bildet, wahrscheinlich mit einer Stöchiometrie von 2:2.

Die Tatsache, dass die Neuropilin-Bindung mit der Dimerisierung von Sema3A-65K konkurriert, deutet darauf hin, dass die Bindungsstelle für Nrp-1 mit den für die Dimerisierung notwendigen Sequenzen überlappt. Während alle Klasse 3 Semaphorine mit Ausnahme von Sema3E Neuropiline als Korezeptoren benötigen, interagiert z.B. Sema4D nicht mit Neuropilin, sondern direkt mit Plexin-B1 als Rezeptor. Deshalb gab eine von der Struktur geleitete Analyse der Verteilung konservierter Aminosäurereste Aufschluss über die potentielle Nrp-1 Bindungsstelle. Das einzige zwischen Klasse 3 aber nicht zwischen Klasse 3 und Klasse 4 Semaphorinen konservierte Profil an der Oberfläche überlappt mit den für die Dimerisierung notwendigen Sequenzen von Sema3A-65K. Zwei Sema3A-65K Mutanten, die

Deletionen in der potentiellen Nrp-1 Bindungsstelle tragen, wurden analysiert und zeigten keine kollabierende Wirkung im COS-7 Kollaps-Assay. Damit konnte die Nrp-1 Bindungsstelle, die Bereiche der 4. und 5. Schleife des β -Propellers beinhaltet, identifiziert werden. In Übereinstimmung mit der Sequenzanalyse bindet ein neutralisierender Antikörper spezifisch an die Schleife, die in Sema3A- Δ 2 deletiert ist (Aminosäuren 359 – 366) (Shirvan et al., 2002). Desweiteren zeigen Peptide, die den Sema3A Aminosäuren 363 – 380 entsprechen, einen ähnlichen repulsiven Effekt wie das vollständige Sema3A (Shirvan et al., 2002).

Die Notwendigkeit von Neuropilin als Korezeptor ist eine Besonderheit der meisten Klasse 3 Semaphorine, die nicht ohne diesen Korezeptor Typ A Plexine aktivieren können. Eine direkte Interaktion zwischen Klasse 3 Semaphorinen und Plexinen konnte bisher nicht gezeigt werden. Die einzige Ausnahme bildet Sema3E, das direkt mit PlexinD1 interagiert (Gu et al., 2005). Eine Kristallstrukturanalyse von Sema3E könnte im Vergleich zu Sema3A und Sema4D einen Aufschluss darüber geben, welche Sequenzunterschiede zwischen Sema3E und anderen Klasse 3 Semaphorinen entscheidend für diese Eigenschaft sind. Dagegen interagieren *Drosophila*-Sema-1, Sema6D und Sema7A jeweils direkt mit Plexin-A, Plexin-A1 bzw. Plexin-C1 (Tamagnone et al., 1999; Toyofuku et al., 2004; Winberg et al., 1998).

Neben der Identifizierung der Nrp-1 Bindungsstelle gab die Kristallstruktur von Sema3A-65K zusätzlich Hinweise darauf, dass Sema3A ebenfalls eine Bindungsstelle für Plexin besitzen könnte. Eine Region von 70 Aminosäuren innerhalb der Semaphorin-Domäne der Klasse 3 Semaphorine bestimmt die Spezifität der Interaktion mit den Rezeptoren (Koppel et al., 1997). Durch die Kristallstrukturanalyse wurde gezeigt, dass diese Region (Reste 166 – 235) die dritte Schleife der β -Propeller-Struktur bildet. Die größten Semaphorin/Semaphorin Kontakte, die durch die Kristallpackung entstehen, befinden sich an der gleichen Position. Es ist denkbar, dass diese Stelle eine biologisch relevante Interaktionsstelle darstellt. Da bei einer Interaktion von Sema3A mit Plexin-A1 wahrscheinlich eine direkte, aber schwache Bindung der Semaphorin-Domänen involviert ist, könnten diese Semaphorin/Semaphorin Kontakte im Kristall eine Interaktion des Liganden mit der Rezeptoruntereinheit Plexin-A1 nachahmen. Ein weiteres Argument für eine direkte Interaktion zwischen Sema3A und Plexin-A1 ist, dass sich Nrp-1/Plexin-A1 Komplexe in ihren Bindungseigenschaften für Sema3A signifikant von Nrp-1 unterscheiden. Durch die Bildung von Nrp-1/Plexin-A1 Komplexen wird nicht die Affinität für Sema3A (der K_D -Wert) im Vergleich zu Nrp-1 verändert, wohl aber wird die Anzahl der Bindungsstellen für Sema3A erhöht (Rohm et al., 2000a). Dies lässt vermuten, dass Plexin an der Bindung von Sema3A beteiligt ist und die Bindung des Liganden an den

Rezeptor erhöht. Da Sema3A und Sema3F beide Nrp-1 mit hoher und vergleichbarer Affinität binden (Feiner et al., 1997), sind die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten dieser Semaphorine durch Interaktion mit unterschiedlichen Typ A Plexinen erklärbar. Durch die Generierung von Mausmutanten konnte gezeigt werden, dass Plexin-A4 *in vivo* die Effekte von Sema3A und Plexin-A3 die Effekte von Sema3F vermittelt (Cheng et al., 2001; Yaron et al., 2005). Plexin-A3^{-/-}/Plexin-A4^{-/-} Mäuse zeigen ähnliche Defekte axonaler Projektionen wie Nrp-1 oder Nrp-2 Mutanten. Sema3F zeigt *in vitro* auf Neurone von Plexin-A3 „Knock-out“ Mäusen, die sowohl Nrp-1 als auch Nrp-2 exprimieren, keine repulsive Wirkung. Der Effekt von Sema3A auf diese Neurone ist jedoch nur schwach reduziert. Dagegen sind Neurone von Plexin-A3^{-/-}/Plexin-A4^{-/-} Mäusen nicht mehr sensitiv für die repulsiven Effekte von Sema3A.

Um das Vorhandensein einer direkten Bindungsstelle für Plexin-A1 zu bestätigen, wurde eine Mutante von Sema3A mit einer Deletion in der potentiellen Bindungsstelle für Plexin-A1 generiert. Das in HEK 293T Zellen exprimierte Protein zeigte keine kollabierende Wirkung im COS Kollaps-Assay. Allerdings besitzt dieses Protein auch eine geringere Affinität für Nrp-1. Die reduzierte Affinität für Nrp-1 könnte in einer durch diese Deletion bedingte Strukturveränderung begründet sein. Um auszuschließen, dass der Verlust der Aktivität der Deletionsmutante durch eine Beeinträchtigung der Interaktion mit Nrp-1 zustande kommt, wurde eine neue Sema3A-Mutante generiert, bei der 3 Aminosäuren innerhalb der potentiellen Plexin-A1 Interaktionsstelle ausgetauscht wurden (H207,208,209A). Das in HEK 293T Zellen exprimierte Protein zeigte die gleiche Affinität für Nrp-1 wie WT Sema3A. Auch die für die Aktivität des Proteins notwendige Dimerisierung war nicht beeinflusst. Im COS Kollaps-Assay war die kollabierende Aktivität des Proteins jedoch stark reduziert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäurereste 207 – 209 der Semaphorin-Domäne von Sema3A für die Aktivierung des Rezeptors wichtig sind. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass diese Aminosäuren Teil der Interaktionsstelle von Sema3A für Plexin-A1 sind. Bei der Interaktion von Sema3A und Plexin-A1 scheinen also die Semaphorin-Domänen beider Proteine involviert zu sein. Da für die Kristallisation aber nur Sema3A verwendet wurde, wird die Interaktionsstelle durch die Semaphorin-Domäne eines weiteren Sema3A-Moleküls besetzt. Einen endgültigen Beweis für eine direkte Interaktion kann allerdings nur durch eine Ko-Kristallisation von Sema3A, Nrp-1 und Plexin-A1 erbracht werden.

Die Lokalisation der für die Dimerisierung und Rezeptorbindung notwendigen Sequenzen scheint zwischen verschiedenen Semaphorinen konserviert zu sein (Abb. 36). Sowohl bei Sema3A als auch bei Sema4D war die lange Insertion in Schleife 5, die für die Semaphorin-Domäne charakteristisch ist, an der Dimerisierung beteiligt. Zusätzlich überlappt die

Dimerisierungsstelle bei Sema3A mit der Bindungsstelle für Nrp-1. Sowohl für Sema4D als auch für Sema3A wird eine zusätzliche Interaktionsstelle für Plexin in der Semaphorin-Domäne vermutet, wobei in beiden Fällen Schleife 3 beteiligt zu sein scheint (Antipenko et al., 2003; Love et al., 2003). Die Interaktionsstellen von Sema3A und Sema4D folgen der generellen Tendenz von β -Propeller Proteinen, die Vorderseite („top face“) der Struktur als Interaktionsstelle zu benutzen. Als Vorderseite wird die Seite des Moleküls bezeichnet, die die Schleifen präsentiert, die jeweils das 2. und 3. Faltblatt und das 4. und 1. Faltblatt miteinander verbinden. Die Rückseite („bottom face“) dagegen präsentiert die Schleifen, die das 1. und 2. und das 3. und 4. Faltblatt miteinander verbinden. Die Semaphorin-Domäne von MET interagiert über die Schleifen 2 und 3 mit der β -Kette seines Liganden HGF (*hepatocyte growth factor*). Anders als bei den Semaphorinen liegt diese Interaktionsstelle auf der Rückseite des β -Propellers (Stamos et al., 2004). Dies könnte andeuten, dass es mit anderen Liganden, wie Plexin-B1, über die Vorderseite interagiert, wofür es jedoch bisher keine experimentellen Hinweise gibt.

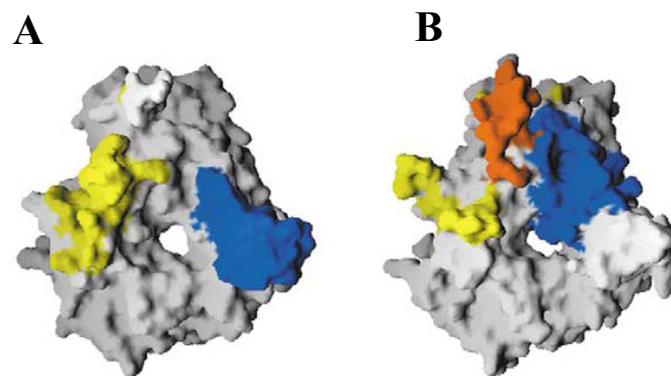


Abb. 36: Interaktions- und Dimerisierungsstellen von Sema4D und Sema3A. (A) Die Dimerisierungsstelle (mit Beteiligung der 4. und 5. Schleife) in Sema4D ist gelb und die potentielle Plexin-Interaktionsstellen blau markiert. (B) Die an der Nrp-1 Bindung beteiligten Schleifen 4 und 5 in Sema3A sind in gelb und orange markiert und überlappen mit der Dimerisierungsstelle. Die potentielle Plexin-A1 Interaktionsstelle ist blau markiert (modifiziert nach Gherardi et al., 2004).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, den Strukturdaten sowie vorherigen Publikationen ergibt sich das im Folgenden beschriebene Modell für die Initiation der Semaphorin-induzierten Signalkaskade (Abb. 37). In Abwesenheit von Sema3A befindet sich Plexin-A1 in einer autoinhibierten Konformation, in der die amino-terminale Semaphorin-Domäne intramolekular mit den carboxy-terminalen Teilen (IPT-Domäne) der extrazellulären Domäne

interagiert (Takahashi and Strittmatter, 2001). In diesem Zustand befindet sich die zytoplasmatische Domäne durch eine weitere intramolekulare Interaktion ebenfalls in einer inaktiven Konformation. Nrp-1 interagiert sowohl mit der IPT-Domäne als auch mit der Semaphorin-Domäne von Plexin-A1 und stabilisiert dadurch die inaktive Form des Proteins. Die Bindung von Sema3A an Nrp-1 erfolgt mit einer Stöchiometrie von 2:2 und induziert eine Konformationsänderung von Plexin-A1, durch welche die Ektodomäne aus der intramolekularen Interaktion entlassen und nach Übertragung der Konformationsänderung durch die Zellmembran die zytoplasmatische Domäne aktiviert wird. Bei der Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne wird die intramolekulare Interaktion der Subdomänen aufgehoben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Sema3A zwei verschiedene Interaktionsstellen für seinen Rezeptor besitzt. Dies erklärt, wie die Bindung von Sema3A an den Rezeptor Plexin-A1 aktiviert. Die erste Interaktionsstelle überlappt mit der Dimerisierungsstelle von Sema3A und ist verantwortlich für eine sehr starke Bindung an Nrp-1. Die zweite Interaktionsstelle befindet sich an der Seite des β -Propellers. Durch Bindung von Sema3A an Nrp-1 wird diese zweite Interaktionsstelle für Plexin-A1 verfügbar. Die Interaktion von Sema3A mit der Semaphorin-Domäne von Plexin-A1 verdrängt die intramolekulare Interaktion von Plexin-A1 und induziert die aktive Konformation der Ektodomäne, welche auf die zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1 übertragen wird. Dies aktiviert die nachgeschaltete Signalkaskade. In dem aktivierten Rezeptorkomplex bleibt Nrp-1 mit Plexin-A1 über dessen Semaphorin-Domäne assoziiert (Takahashi and Strittmatter, 2001). Die beiden Rezeptoruntereinheiten interagieren jedoch ebenfalls indirekt über den gebundenen Liganden Sema3A. Dies könnte möglicherweise die Zunahme der Bindungsstellen für Sema3A durch die Bildung von Nrp-1/Plexin-A1 Komplexen erklären. Andere Semaphorine, wie z.B. Sema4D, aktivieren Plexine direkt (Tamagnone et al., 1999). In diesem Fall besitzt Sema4D eine Interaktionsstelle für Plexin-B1, die schon vor der Bindung an den Rezeptor verfügbar ist. Der Ligand besitzt dabei eine hohe Affinität für den Rezeptor und benötigt keinen Korezeptor (Abb. 37B).

Bei Plexinen scheint es ähnliche Mechanismen der Konformationsänderung zu geben, wie sie für Integrine beschrieben sind (Hynes, 2002; Takagi et al., 2002). Integrine sind Oberflächen-Rezeptoren, die Komponenten der Extrazellulären Matrix binden und so Zelladhäsion, Migration und Wachstum beeinflussen. Der Integrin-Rezeptor, der aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht, liegt in verschiedenen Konformationen vor (Abb. 37C). Vor der Aktivierung des Integrins befinden sich die extrazellulären Domänen in einer „gebeugten“,

wenig affinen Konformation. Dabei interagieren die amino-terminalen und carboxy-terminalen Bereiche der extrazellulären Domäne miteinander. Die Aktivierung des Integrins kann durch die Bindung eines Liganden („outside-in signaling“) oder durch die Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne („inside-out signaling“) durch zytosolische Proteine erfolgen. Bei dieser Aktivierung kommt es zu starken Konformationsänderungen, die über die Zellmembran von der extrazellulären Domäne auf die zytoplasmatische Domäne oder in umgekehrter Richtung übertragen werden. Die extrazellulären Domänen richten sich dabei auf und besitzen so eine starke Affinität für den Liganden. Durch FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Analysen konnte gezeigt werden, dass es bei der Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne zu einer räumlichen Trennung der α und β Kette kommt, die sich im inaktiven Zustand in räumlicher Nähe befinden (Kim et al., 2003). Diese Trennung induziert eine Konformationsänderung, durch die sie mit zytoplasmatischen Proteinen wie Talin interagieren können. Ein Aktivator der „inside-out“ Signalkaskade ist z.B. R-Ras, welches nicht direkt mit Integrinen interagiert, sie jedoch aktiviert und damit ihre Affinität erhöht (Kinbara et al., 2003).

Plexine werden ebenfalls nicht nur durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor aktiviert, sondern auch durch die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit GTPasen (Oinuma et al., 2004b; Turner et al., 2004; Zanata et al., 2002). Durch die Interaktion von Plexin-A1 und Plexin-B1 mit Rac1 bzw. Rnd1 wird die intramolekulare Interaktion der carboxy-terminalen mit der amino-terminalen Region aufgehoben. Die Interaktion von Plexin-B1 mit Rnd1 induziert nicht nur die Aufhebung der intramolekularen Interaktion, sondern aktiviert auch eine für R-Ras spezifische GAP-Aktivität von Plexin-B1 (Oinuma et al., 2004a). Die Inhibierung von R-Ras könnte die Aktivierung von Integrinen verhindern und so die Zelladhäsion reduzieren. Demnach scheint es bei Plexinen einen ähnlichen Mechanismus von „inside-out signaling“ zu geben wie bei Integrinen.

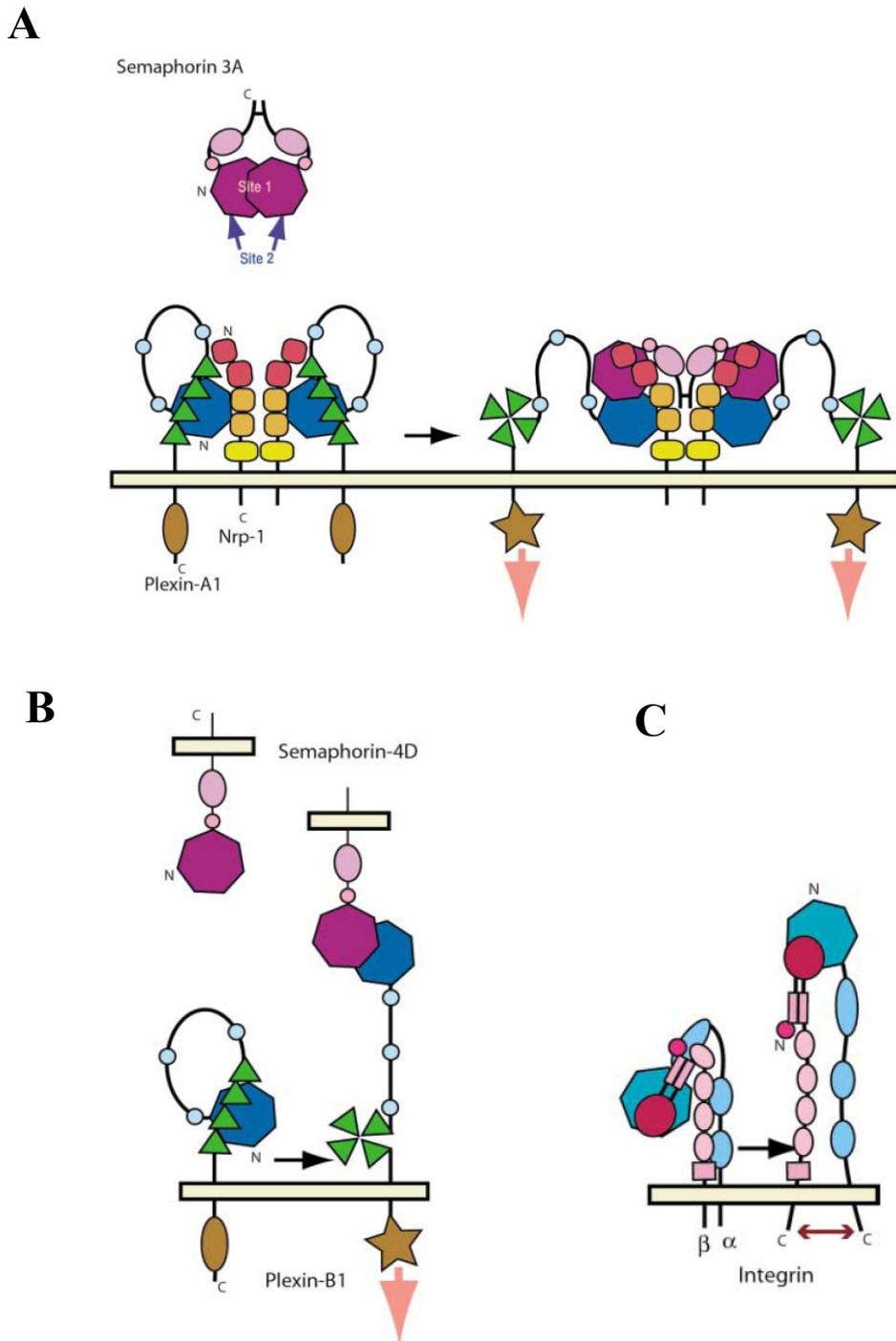


Abb. 37: Modell für die Aktivierung des Semaphorin-Rezeptors. Die Initiation der Signaltransduktion durch Plexine ist wie im Text genauer beschrieben hier schematisch im Vergleich zur Integrin-Aktivierung dargestellt. (A) Die Aktivierung des Sema3A-Rezeptors. Sema3A ist lila dargestellt (Semaphorin-Domäne, Heptagon; PSI-Domäne, Kreis; Ig-Domäne, Oval). Die Semaphorin-Domäne von Plexin ist blau, die IPT-Domäne grün und die PSI-Domänen hellblau dargestellt. Die zytoplasmatische Domäne von Plexin ist braun markiert. Die A-, B-, und MAM-Domänen von Nrp-1 sind rot, braun und gelb dargestellt. (B) Die Aktivierung des Sema4D-Rezeptors Plexin-B1 (Symbole wie in A). (C) Die Aktivierung von Integrin. Die α -Untereinheit ist blau und die β -Untereinheit ist rot dargestellt (modifiziert nach Antipenko et al., 2003).

4.1.2 Analyse der Sema3A-induzierten Signalkaskade

4.1.2.1 Etablierung einer Sema3A-sensitiven Zelllinie

Zur funktionellen Analyse von Sema3A wurde zunächst eine Sema3A-sensitive Zelllinie etabliert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass Sema3A innerhalb von 60 Minuten den Kollaps einer humanen Neuroblastom-Zelllinie (Shep-SF; Ross et al., 1983) induziert. Dieser Kollaps ist ähnlich wie bei COS-7 Zellen durch eine starke Depolymerisierung der Aktinfilamente gekennzeichnet, während die Mikrotubuli jedoch nicht beeinflusst werden. Damit wurde ein neues Modellsystem zur Analyse der von Sema3A induzierten Signalkaskade gefunden. Im Gegensatz zu COS-7 Zellen exprimieren Shep-SF Zellen einen Sema3A-Rezeptor, so dass keine Transfektion mit den Expressionsvektoren für Nrp-1 und Plexin-A1 notwendig ist. Dies erleichtert es, Aktivitätsänderungen von endogenen GTPasen zu untersuchen. Da es sich bei Shep-SF Zellen um eine humane Zelllinie handelt, ist auch das Ausschalten endogener Proteine durch siRNA relativ leicht durchzuführen. Der Shep-SF Kollaps-Assay hat ebenfalls Vorteile gegenüber dem Wachstumskegellkollaps-Assay. Shep-SF Zellen sind wesentlich unempfindlicher und einfacher zu kultivieren als Neurone. Außerdem kann Sema3A unterschiedliche Effekte auf die Dendriten und Axone von Neurone haben. Werden nach Zugabe von Sema3A Aktivitätsänderungen von Proteinen gemessen, können diese nicht mit Sicherheit einem einzelnen Signalweg zugeordnet werden. Der Shep-SF Kollaps-Assay ist damit ein geeignetes System zur funktionellen Analyse von Sema3A. In dieser Arbeit wurden Shep-SF Zellen verwendet, um eine Änderung der Aktivität von RhoD nach Behandlung der Zellen mit Sema3A zu untersuchen.

4.1.2.2 Analyse der Funktion von RhoD

Die zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1 interagiert mit den GTPasen RhoD und Rnd1 (Rohm et al., 2000b; Zanata et al., 2002). Die Koexpression von Plexin-A1 und Rnd1 in COS-7 Zellen aktiviert Plexin-A1 und führt zum ligandenunabhängigen Kollaps der Zellen. RhoD zeigt zu Rnd1 einen antagonistischen Effekt und inhibiert sowohl den Sema3A-induzierten als auch den durch die Koexpression von Plexin-A1 und Rnd1 induzierten Kollaps von COS-7 Zellen, sowie den repulsiven Effekt von Sema3A auf sympathische Axone (Zanata et al., 2002).

Bisher sind der Mechanismus und die Funktion der Interaktion zwischen RhoD und Plexin-A1 unbekannt. RhoD könnte durch Bindung der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 eine inaktive Konformation induzieren. Da die Interaktionsstelle von Plexin-A1 für RhoD und Rnd1 überlappt, ist es aber auch möglich, dass RhoD und Rnd1 um die Bindung an Plexin-A1 konkurrieren. Da die Interaktion von Rnd1 und Plexin-A1 wahrscheinlich für die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade essentiell ist, könnte RhoD durch die Besetzung der Rnd1-Bindungsstelle den Effekt von Sema3A inhibieren. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass RhoD den Signalweg durch Interaktion mit einem anderen Effektormolekül blockiert.

Zunächst sollte daher die Frage beantwortet werden, ob die Interaktion von RhoD mit Plexin-A1 für die Inhibition des Sema3A-induzierten Kollaps verantwortlich ist. Es wurden verschiedene RhoD Mutanten hinsichtlich ihrer Interaktion mit Plexin-A1 und ihrem Effekt im COS-7 Kollaps-Assay analysiert. Die Proteine enthalten jeweils einen Aminosäureaustausch in der Region, über die RhoD mit anderen Effektormolekülen interagiert („Effektor Loop“). Es konnte gezeigt werden, dass eine RhoD Mutante (RhoDT49S), die nicht mehr mit Plexin-A1 interagiert, dennoch den Sema3A-induzierten Kollaps inhibiert. Damit wurde nachgewiesen, dass RhoD den Zellkollaps nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, durch die Interaktion mit Plexin-A1 blockieren kann. Daher wurde untersucht, ob die Interaktion von RhoD mit einem anderen Effektormolekül für den Effekt von RhoD im Sema-3A induzierten Signalweg verantwortlich ist. Neben Plexin-A1 interagiert RhoD mit humanem Diaphanous2C (hDia2C) über dessen GTPase-Bindedomäne (GBD) und entlässt hDia2C dadurch aus einer autoinhibierten Konformation (Gasman et al., 2003). Humanes Dia2C wurde als eine neue Splicevariante von hDia2 identifiziert. Es unterscheidet sich von hDia2B durch eine Deletion von 11 Aminosäuren (43 – 53) und durch eine Insertion von 7 Aminosäuren (149 – 155) innerhalb der Amino-terminalen GTPase-Bindedomäne. Da RhoD nicht mit hDia2B interagiert, scheint die Deletion und/oder Insertion für die Bindung mit RhoD verantwortlich zu sein. Der Carboxy-Terminus von hDia2C ist ca. 70% identisch zu Dia3 aus der Maus.

Durch die Interaktion mit RhoD wird hDia2C aus dem Zytosol an frühe Endosomen rekrutiert und inhibiert dort deren Motilität. Die Expression von aktivem RhoD und hDia2C in Hela Zellen führt zu einer erhöhten Bildung von Aktin-Stressfasern, einer parallelen Ausrichtung der Mikrotubuli und einer Aufreihung von frühen Endosomen entlang von Aktinfilamenten. Da die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D, welches eine Depolymerisierung der Aktinfilamente induziert, den Effekt von RhoD und hDia2C reduziert, wird die verminderte

Motilität der Endosomen offenbar durch eine stärkere Interaktion mit Aktinfilamenten induziert. Durch RhoD aktiviertes hDia2C rekrutiert die Kinase Src an frühe Endosomen und stimuliert deren Kinaseaktivität, welche für die Effekte von RhoD und hDia2C essentiell ist (Gasman et al., 2003).

Da die Aktivierung von hDia2C durch RhoD Auswirkungen auf Aktinfilamente und Endosomen hat, ist es wahrscheinlich, dass die Bindung von RhoD an Dia2C in einem direkten Zusammenhang mit der Inhibition der Effekte von Sema3A steht. Deshalb wurden die zuvor beschriebenen RhoD Mutanten hinsichtlich ihrer Interaktion mit hDia2C untersucht. Nur die Mutante RhoDF51G, die als einzige nicht den Kollaps von COS-7 Zellen inhibierte, interagiert weder mit Plexin-A1 noch mit hDia2C. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von RhoD an hDia2C für die Inhibition der Effekte von Sema3A verantwortlich ist und nicht die Bindung an Plexin-A1.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von hDia2C den Sema3A-induzierten Kollaps von COS-7 Zellen blockiert, wurde eine konstitutiv aktive Form von Dia2C verwendet. Bei dieser Mutante wurde die GTPase-Bindedomäne deletiert (hDia2C Δ GBD), weshalb sie nicht in der autoinhibierten Konformation vorliegt. Aktives hDia2C blockiert den Kollaps von Plexin-A1 und Nrp-1 exprimierenden COS-7 Zellen nach Zugabe von Sema3A. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von hDia2C vermutlich der Grund ist, weshalb die Expression von RhoD den Kollaps blockiert. Es ist denkbar, dass Plexin-A1 und hDia2C um die Bindung von RhoD konkurrieren. Die Bindung von RhoD an Plexin-A1 würde dabei die RhoD-abhängige Aktivierung von hDia2C reduzieren und so einen Kollaps ermöglichen. Bisher ist nicht bekannt, ob sich nach Bindung von Sema3A an seinen Rezeptor die Aktivität und Verteilung von RhoD ändert. Deshalb wurde ein „GST-Pulldown“-Assay etabliert, bei dem mit Hilfe der GTPase-Bindedomäne von hDia2C (hDia2C-GBD) die Menge an GTP-gebundenem RhoD gemessen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass GST-hDia2C selektiv mit der GTP-gebundenen Form von RhoD interagiert. Anschließend wurde versucht, mit Hilfe dieses GST-Fusionsproteins Aktivitätsänderungen von endogenem RhoD während des durch Sema3A ausgelösten Kollaps zu messen. Als System für diesen Assay wurde die Neuroblastom-Zelllinie Shep-SF benutzt, die innerhalb von 60 – 90 Minuten nach Zugabe von Sema3A kollabieren. Allerdings konnte in der Western-Blot-Analyse mit dem verwendeten polyklonalen α -RhoD Antikörper nicht spezifisch RhoD nachgewiesen werden. Um eine Aussage über die Aktivitätsänderung von RhoD in Shep-SF Zellen nach Zugabe von Sema3A machen zu können, wäre ein α -RhoD Antikörper höherer Spezifität notwendig, der

jedoch gegenwärtig nicht verfügbar ist. Eine Veränderung der Aktivität von RhoD in Shep-SF Zellen konnte daher nicht untersucht werden.

Mit den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von Plexin-A1 nicht notwendig ist, damit RhoD den Kollaps von COS-7 Zellen inhibieren kann. Daher ist es wahrscheinlich, dass RhoD den Effekt von Sema3A weder durch Induktion einer Konformationsänderung von Plexin-A1 noch durch Konkurrenz mit Rnd1 um Interaktion mit Plexin-A1 blockiert. Vielmehr könnte die Interaktion mit Plexin-A1 die RhoD-abhängige Aktivierung von hDia2C verhindern. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für Plexin-B1 und Rac1 beschrieben (Vikis et al., 2002). Dabei wurde postuliert, dass Plexin-B1 nach Aktivierung durch Sema4D verstärkt mit aktivem Rac1 interagiert, wodurch dieses nicht mehr für die Aktivierung von PAK verfügbar ist. Gleichzeitig führt die Aktivierung von Plexin-B1 zur Aktivierung von RhoA und zur Inaktivierung von R-Ras. Beim durch Sema3A und Sema4D ausgelösten Kollaps der Wachstumskegel wird die Depolymerisierung von Aktinfilamenten induziert. Durch die Aktivierung von hDia2C kommt es dagegen zur verstärkten Bildung von Aktin-Stressfasern. Außerdem wird die Motilität der frühen Endosomen reduziert, die eine wichtige Rolle bei der Endozytose spielen. Der Kollaps von Wachstumskegeln nach Sema3A Zugabe ist mit einer erhöhten Endozytose des Sema3A Rezeptors verbunden (Fournier et al., 2000; Journey et al., 2002). In Nrp-1 und L1CAM exprimierenden COS-7 Zellen führt die Inkubation mit Sema3A durch einen Clathrin-abhängigen Mechanismus zur Internalisierung von Nrp-1 und L1 (Castellani et al., 2004). Diese Internalisierung ist mit einer Zellkontraktion verbunden, ähnlich wie es nach Inkubation von Nrp-1 und Plexin-A1 exprimierenden COS-7 Zellen mit Sema3A zu beobachten ist. Die Funktion der Sema3A abhängigen Endozytose ist nicht vollständig verstanden. In retinalen Wachstumskegeln kommt es nach der Inkubation von Sema3A oder Netrin-1 innerhalb von zwei Minuten zu einer ligandenspezifischen Desensibilisierung, die abhängig von einer Clathrin-vermittelten Endozytose ist. Anschließend kommt zu einer Resensibilisierung des Wachstumskegels, die von Protein Synthese abhängig ist (Piper et al., 2005). Während der Desensibilisierung wird Nrp-1 bzw. DCC internalisiert. Es ist wahrscheinlich, dass Endozytose neben der Desensibilisierung eine weitere wichtige Rolle während der Navigation des Wachstumskegels spielt. Sowohl die Effekte von Sema3A als auch von Netrin-1 werden durch MAP Kinasen (MAPK) vermittelt (Bagnard et al., 2004; Campbell and Holt, 2003; Ming et al., 2002). Die Aktivierung von MAPK ist in Endozytose-defizienten Zellen inhibiert (Vieira et al., 1996) und es konnte eine Lokalisation von MAPK in endosomalen Kompartimenten gezeigt werden (Pol et al., 1998; Rizzo et al., 2000; Sorkin and Von

Zastrow, 2002). Es ist daher möglich, dass eine Inhibition der Endozytose die Aktivierung von Proteinen inhibiert, die dem Sema3A oder Netrin-1 Rezeptor nachgeschaltet sind, und so die Effekte von Sema3A und Netrin-1 blockiert.

Die durch aktives hDia2C ausgelösten Effekte wirken damit den Effekten von Sema3A entgegen. Auf Basis der beschriebenen Ergebnisse und publizierten Daten lässt sich ein Modell formulieren, dass der für die Interaktion von Plexin-B1 und Rac1 postulierten Funktion ähnlich ist (Abb. 38). In der inaktiven Konformation interagiert die zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 nur schwach mit RhoD. Deshalb steht RhoD für eine Interaktion mit der GTPase-Bindedomäne von hDia2C zur Verfügung und aktiviert hDia2C. Als Konsequenz wird hDia2C an frühe Endosomen rekrutiert und reduziert dort deren Motilität. Durch die Aktivierung des Rezeptors durch Sema3A kommt es zur Konformationsänderung der extrazellulären Domäne von Plexin-A1. Diese Konformationsänderung wird durch die Zellmembran auf die zytoplasmatische Domäne übertragen, wodurch die Interaktion der beiden zytoplasmatischen Subdomänen beendet wird. In dieser aktiven Konformation kann die zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1 RhoD binden, das damit nicht mehr für die Aktivierung von hDia2C zur Verfügung steht. Durch Aktivierung einer parallelen Signalkaskade durch Sema3A, bei der die Interaktion von Plexin-A1 mit anderen Proteinen wie Fes, Fyn, MICAL und Rnd1 involviert ist, kommt es zur Depolymerisierung von Aktinfilamenten, die gleichzeitig mit einer verstärkten Endozytose verbunden ist.

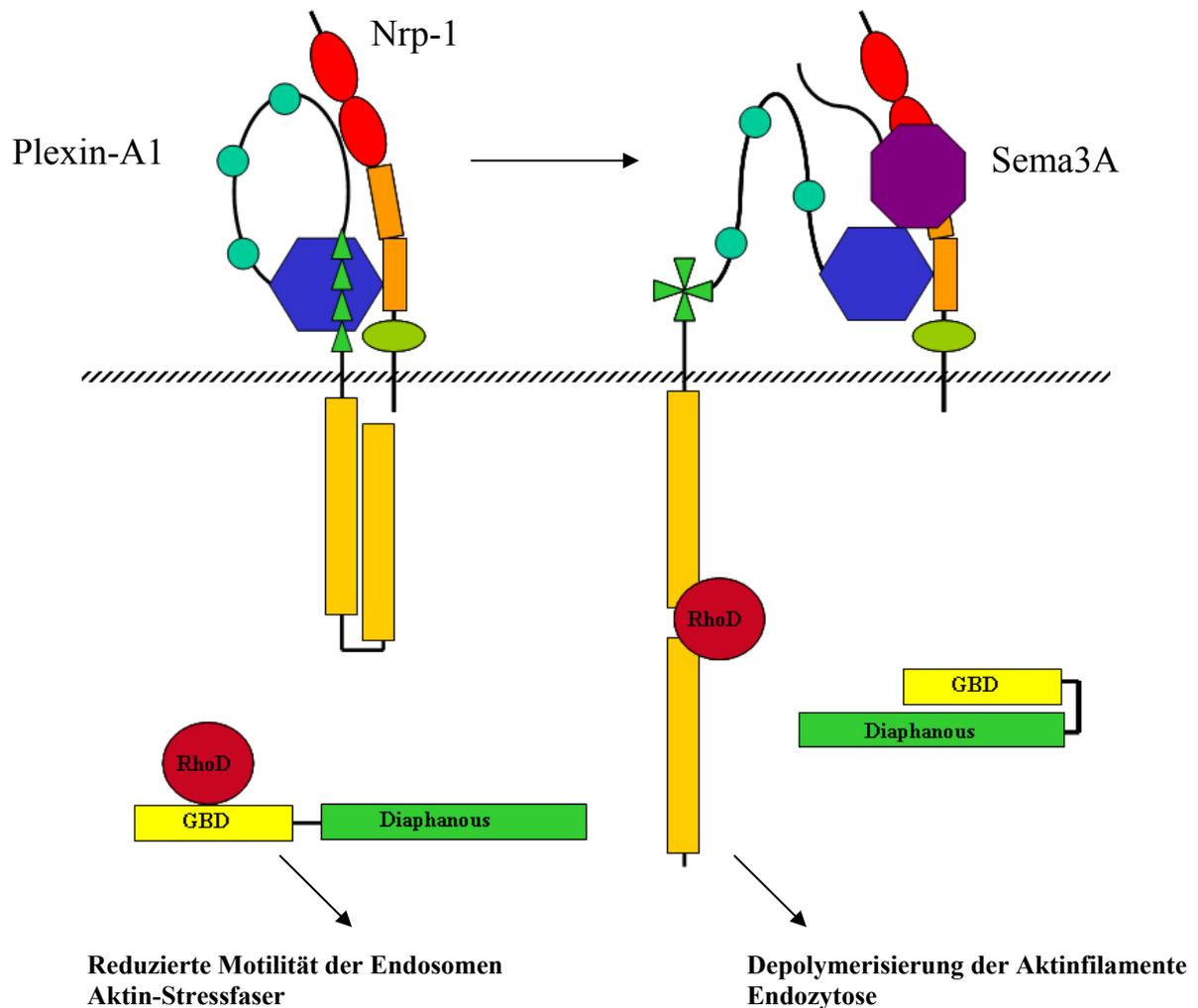


Abb. 38: Modell für die Regulation von RhoD durch Plexin-A1. (A) In der aktiven Konformation interagiert die zyttoplasmatische Domäne von Plexin-A1 nur schwach mit RhoD, so dass RhoD für die Aktivierung von hDia2C zur Verfügung steht. Die Aktivierung von hDia2C bewirkt eine reduzierte Motilität der frühen Endosomen. (B) Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Konformationsänderung der zyttoplasmatischen Domäne von Plexin-A1. Diese erlaubt die verstärkte Interaktion von Plexin-A1 mit RhoD, so dass die Aktivierung von hDia2C inhibiert wird. Durch Aktivierung einer parallelen Signalkaskade, bei der z.B. die Interaktion von Plexin-A1 mit Fes, Fyn, MICAL und Rnd1 involviert ist, wird die Depolymerisierung der Aktinfilamente induziert und gleichzeitig Endozytose verstärkt.

4.1.2.3 Untersuchung der potentiellen GAP-Aktivität von Plexin-A1

Die zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1 zeigt Sequenz-Homologie zu RasGAPs, insbesondere zu R-RasGAP und SynGAP. Zwei konservierte Arginin-Reste innerhalb der GAP-Homologie entsprechen den für die katalytische Aktivität notwendigen Arginin-Resten der GAPs und sind für die Funktion von Plexin-A1 in der von Sema3A induzierten Signalkaskade essentiell, so dass Plexin-A1 GAP-Aktivität besitzen könnte (Rohm et al., 2000b). Es wurde deshalb untersucht, ob Plexin-A1 nach Aktivierung durch Sema3A, Rnd1 oder Rac1 GAP-Aktivität besitzt. Kürzlich wurde für Plexin-B1 eine für R-Ras spezifische GAP-Aktivität beschrieben (Oinuma et al., 2004b; Oinuma et al., 2004a). Rnd-1 gebundenes Plexin-B1 bildet einen Komplex mit R-Ras. Durch eine Plexin-B1 Mutante, die nicht mit Rnd1 interagiert, wird diese Komplexbildung verhindert. Ebenfalls sind die konservierten Arginin-Reste der GAP homologen Domänen für die Interaktion mit R-Ras essentiell. Nach Aktivierung von Plexin-B1 durch Sema4D zeigt Rnd1-gebundenes Plexin-B1 eine für R-Ras spezifische GAP-Aktivität und inaktiviert R-Ras (Oinuma et al., 2004a). Ebenfalls wurde gezeigt, dass eine dominant negative Mutante von R-Ras den durch Sema3A ausgelösten Kollaps von Wachstumskegeln inhibiert.

Deshalb wurde die potentielle GAP-Aktivität von Plexin-A1 untersucht. Mittels einer „Stopped-Flow“-Apparatur wurde die Hydrolyse von an R-Ras oder H-Ras gebundenem TAMRA-GTP in Anwesenheit von Membranfraktionen transfizierter COS-7 Zellen fluoreszenzspektroskopisch gemessen. Die COS-7 Zellen exprimierten entweder Plexin-A1 und Rnd1, Plexin-A1 und Rac1 oder Plexin-A1 und Nrp-1. Die Zellen wurden vor Reinigung der Membranfraktionen mit Sema3A behandelt. Als Positivkontrolle wurde das RasGAP NF1-333 GAP verwendet. In Anwesenheit der verschiedenen Membranfraktionen konnte jedoch keine Beschleunigung der GTP-Hydrolyse von R-Ras oder H-Ras gemessen werden. Daher konnte die Frage, ob Plexin-A1 GAP-Aktivität besitzt, nicht abschließend beantwortet werden.

R-Ras spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion durch die Aktivierung von Integrinen und fördert Zellmigration und das Auswachsen von Neuriten (Ivins et al., 2000; Keely et al., 1999; Zhang et al., 1996). Sema3A inhibiert die Migration von Neuronen und Endothelzellen (Eickholt et al., 1999; Marin et al., 2001; Serini et al., 2003). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass Plexin-A1 nach Aktivierung durch Sema3A ebenfalls GAP-Aktivität für R-Ras besitzt und es inaktiviert. Durch diesen Mechanismus könnte es ein „inside-out signaling“ geben, bei dem die aktivierte zytoplasmatische Domäne durch die

Inaktivierung von R-Ras Integrine inhibiert, und so die Zelladhäsion reduziert. Möglicherweise fehlte in dem verwendeten *in vitro* Assay eine essentielle Komponente, um eine GAP-Aktivität von Plexin-A1 nachzuweisen. Aber es ist ebenfalls denkbar, dass Plexin-A1 andere GTPasen als R-Ras und H-Ras reguliert.

Zusammenfassend lässt sich für die Rolle der bekannten GTPasen, die mit Plexin-A1 interagieren oder potentiell von Plexin-A1 reguliert werden, das im Folgenden beschriebene Modell formulieren (Abb. 39). Die zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1 interagiert direkt mit den GTPasen Rnd1, Rac1 und RhoD. Während Rac1 und Rnd1 Plexin-A1 aktivieren, scheint die Bindung von RhoD an Plexin-A1 die RhoD-abhängige Aktivierung von hDia2C zu verhindern. Da es unwahrscheinlich ist, dass alle GTPasen gleichzeitig an Plexin-A1 binden, könnte die Konformation der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 die selektive Interaktion mit den GTPase bestimmen. Die Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-A1 induziert die Depolymerisierung der Aktinfilamente, wobei Proteine wie Fes, MICAL und Fyn, die ebenfalls mit Plexin-A1 interagieren, involviert sind. Plexin-A1 könnte ebenfalls GAP-Aktivität für R-Ras besitzen, wodurch es zur Inhibition von Integrinen kommen könnte. Der Verlust der Zelladhäsion und die Depolymerisierung der Aktinfilamente führen zum Zellkollaps oder zur Repulsion, was mit einer erhöhten Endozytose verbunden ist (Abb. 39).

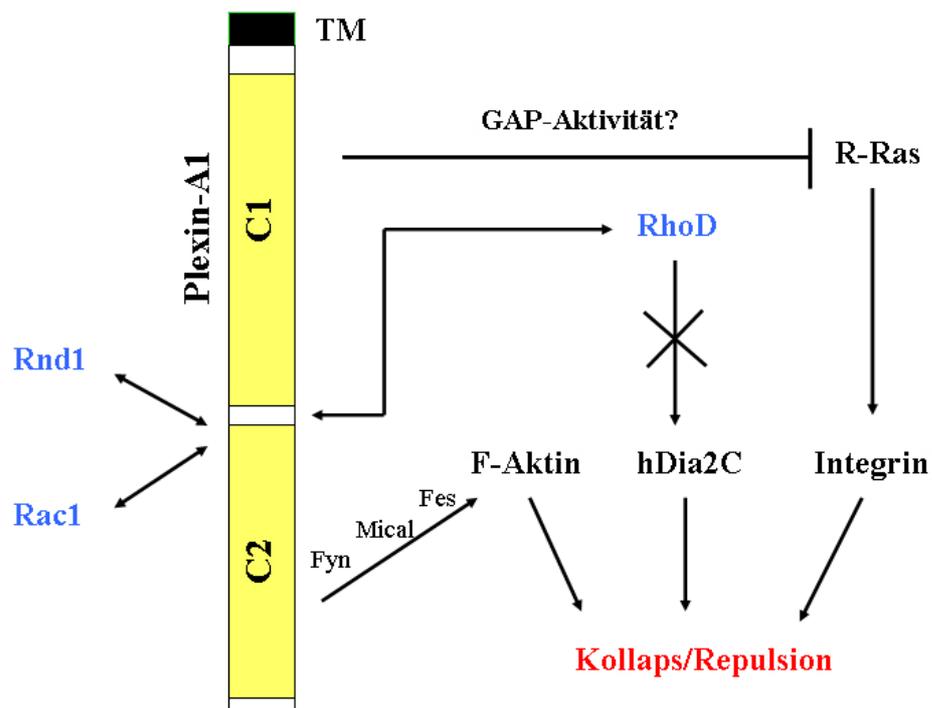


Abb. 39: Die Rolle von GTPasen im Plexin-A1 vermittelten Signalweg. Die zytosmatische Domäne von Plexin-A1 interagiert mit den GTPasen Rnd1, Rac1 und RhoD (blau). Während Rnd1 und Rac1 Plexin-A1 aktivieren, scheint die Interaktion von RhoD mit Plexin-A1 die Aktivierung von hDia2C zu verhindern. Plexin-A1 könnte ebenfalls eine GAP-Aktivität für R-Ras besitzen und damit Integrine inhibieren. Weitere Proteine, die mit Plexin-A1 interagieren wie Fes, MICAL und Fyn sind am Plexin-A1-vermittelten Signalweg beteiligt, der zur Depolymerisierung von Aktinfilamenten und zum Zellkollaps oder zur Repulsion führt.

5 Zusammenfassung

Die Semaphorine repräsentieren die größte Proteinfamilie von Signalmolekülen, die an der axonalen Wegfindung im sich entwickelnden embryonalen Nervensystem beteiligt sind. Allen Semaphorinen ist eine konservierte Semaphorin-Domäne am Amino-Terminus gemeinsam, die aus etwa 500 Aminosäuren besteht und für die Funktion der Semaphorine essentiell ist. Der repulsive Effekt des sezernierten Semaphorins Sema3A wird durch einen Rezeptorkomplex vermittelt, der Nrp-1 als ligandenbindende Untereinheit und ein Typ A Plexin als signaltransduzierende Untereinheit enthält.

Die Struktur der Semaphorin-Domäne war zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Für eine spätere Kristallstrukturanalyse wurde daher zunächst die biologische Aktivität eines 65 kDa Fragmentes von Sema3A (Sema3A-65K), welches die vollständige Semaphorin-Domäne enthält, bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Sema3A-65K wie das vollständige Sema3A einen kollabierenden Effekt hat, der EC50-Wert dieses Fragmentes von Sema3A mit 1,9 μM jedoch deutlich höher liegt. Dies ist vermutlich auf die fehlende kovalente Dimerisierung von Sema3A-65K zurückzuführen. Die Kristallstrukturanalyse des Proteins erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nikolov am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York. Bei der Semaphorin-Domäne handelt es sich um eine Variation der β -Faltblattstruktur, bei der sieben Schleifen um eine zentrale Achse angeordnet sind.

Eine auf der Struktur basierende Analyse konservierter Aminosäurereste gab Aufschluss über potentielle Interaktionsstellen von Sema3A. Durch gezielte Mutagenese und anschließende Analyse der Proteine wurde in dieser Arbeit die Nrp-1 Bindungsstelle von Sema3A in der vierten und fünften Schleife der β -Faltblattstruktur identifiziert.

Die Strukturdaten ließen ebenfalls eine direkte Interaktion von Sema3A mit Plexin-A1 vermuten, wobei die Interaktionsstelle wahrscheinlich erst nach der Bindung des Liganden zugänglich wird. Zur Analyse der potentiellen Bindungsstelle wurden Mutationen in die Sequenz von Sema3A eingeführt und die Sema3A Mutanten analysiert. Diese zeigten keinerlei kollabierende Wirkung, wobei die Affinität für Nrp-1 oder die Dimerisierung nicht beeinträchtigt war. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäurereste 207 – 209, die innerhalb der dritten Schleife der Semaphorin-Domäne von Sema3A liegen, für die Aktivierung des Rezeptors wichtig sind und an einer direkten Interaktion mit Plexin beteiligt sein könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die durch Sema3A aktivierte Signalkaskade analysiert. Die zytoplasmatische Domäne von Plexin-A1 interagiert mit den GTPasen Rac1, Rnd1 und RhoD.

Während Rnd1 den Plexin-A1 vermittelten Zellkollaps induziert, wird dieser durch RhoD inhibiert. In dieser Arbeit sollte die Funktion von RhoD für den von Sema3A induzierten Signalweg untersucht werden. Mit Hilfe von RhoD Mutanten wurde gezeigt, dass die Interaktion von RhoD mit PlexinA1 für die inhibierende Wirkung von RhoD nicht essentiell ist. Vielmehr scheint die Interaktion von RhoD mit dem Protein Diaphanous2C eine wichtige Rolle zu spielen. Die Expression einer aktiven Form von Diaphanous2C führt zur Inhibition des Sema3A-induzierten Zellkollaps. Eine Veränderung der Aktivität von endogenem RhoD nach Bindung von Sema3A an den Rezeptor wurde untersucht, konnte in dieser Arbeit aber nicht gezeigt werden.

Weiterhin wurde *in vitro* untersucht, ob Plexin-A1 GAP-Aktivität für Ras GTPasen besitzt. Mittels einer fluoreszenzspektroskopischen Methode („Stopped-Flow“-Methode) wurden die GTP-Hydrolyse von R-Ras und H-Ras gemessen. Weder durch Sema3A aktiviertes, noch durch Rnd1 oder Rac1 aktiviertes Plexin-A1 zeigte in diesem Assay GAP-Aktivität. Obwohl eine Rnd1-abhängige GAP-Aktivität von Plexin-B1 für R-Ras publiziert wurde und diese auch für Plexin-A1 wahrscheinlich ist, konnte sie in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

6 Referenzen

- Adams,R.H., Betz,H., and Puschel,A.W. (1996). A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech. Dev.* 57, 33-45.
- Adams,R.H., Lohrum,M., Klostermann,A., Betz,H., and Puschel,A.W. (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* 16, 6077-6086.
- Aizawa,H., Wakatsuki,S., Ishii,A., Moriyama,K., Sasaki,Y., Ohashi,K., Sekine-Aizawa,Y., Sehara-Fujisawa,A., Mizuno,K., Goshima,Y., and Yahara,I. (2001). Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat. Neurosci.* 4, 367-373.
- Antipenko,A., Himanen,J.P., van Leyen,K., Nardi-Dei,V., Lesniak,J., Barton,W.A., Rajashankar,K.R., Lu,M., Hoemme,C., Puschel,A.W., and Nikolov,D.B. (2003). Structure of the semaphorin-3A receptor binding module. *Neuron* 39, 589-598.
- Bagnard,D., Lohrum,M., Uziel,D., Puschel,A.W., and Bolz,J. (1998). Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043-5053.
- Bagnard,D., Sainturet,N., Meyronet,D., Perraut,M., Miehe,M., Roussel,G., Aunis,D., Belin,M.F., and Thomasset,N. (2004). Differential MAP kinases activation during semaphorin3A-induced repulsion or apoptosis of neural progenitor cells. *Mol. Cell Neurosci.* 25, 722-731.
- Behar,O., Golden,J.A., Mashimo,H., Schoen,F.J., and Fishman,M.C. (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 383, 525-528.
- Campbell,D.S. and Holt,C.E. (2003). Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* 37, 939-952.
- Castellani,V., Chedotal,A., Schachner,M., Faivre-Sarrailh,C., and Rougon,G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27, 237-249.
- Castellani,V., De Angelis,E., Kenwrick,S., and Rougon,G. (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.* 21, 6348-6357.
- Castellani,V., Falk,J., and Rougon,G. (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol. Cell Neurosci.* 26, 89-100.
- Catalano,S.M., Messersmith,E.K., Goodman,C.S., Shatz,C.J., and Chedotal,A. (1998). Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Mol. Cell Neurosci.* 11, 173-182.

- Chedotal,A., Del Rio,J.A., Ruiz,M., He,Z., Borrell,V., de Castro,F., Ezan,F., Goodman,C.S., Tessier-Lavigne,M., Sotelo,C., and Soriano,E. (1998). Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* *125*, 4313-4323.
- Chen,H., Chedotal,A., He,Z., Goodman,C.S., and Tessier-Lavigne,M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* *19*, 547-559.
- Cheng,H.J., Bagri,A., Yaron,A., Stein,E., Pleasure,S.J., and Tessier-Lavigne,M. (2001). Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* *32*, 249-263.
- Colamarino,S.A. and Tessier-Lavigne,M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* *81*, 621-629.
- Dailey,L.A. and Imming,P. (1999). 12-Lipoxygenase: classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors. *Curr. Med. Chem.* *6*, 389-398.
- de Castro,F., Hu,L., Drabkin,H., Sotelo,C., and Chedotal,A. (1999). Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J. Neurosci.* *19*, 4428-4436.
- Eickholt,B.J., Mackenzie,S.L., Graham,A., Walsh,F.S., and Doherty,P. (1999). Evidence for collapsin-1 functioning in the control of neural crest migration in both trunk and hindbrain regions. *Development* *126*, 2181-2189.
- Eickholt,B.J., Walsh,F.S., and Doherty,P. (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J. Cell Biol.* *157*, 211-217.
- Englund,C., Steneberg,P., Falileeva,L., Xylourgidis,N., and Samakovlis,C. (2002). Attractive and repulsive functions of Slit are mediated by different receptors in the *Drosophila* trachea. *Development* *129*, 4941-4951.
- Feiner,L., Koppel,A.M., Kobayashi,H., and Raper,J.A. (1997). Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilin with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ. *Neuron* *19*, 539-545.
- Fiore,R. and Puschel,A.W. (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Front Biosci.* *8*, s484-s499.
- Foster,R., Hu,K.Q., Lu,Y., Nolan,K.M., Thissen,J., and Settleman,J. (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol. Cell Biol.* *16*, 2689-2699.
- Fournier,A.E., Nakamura,F., Kawamoto,S., Goshima,Y., Kalb,R.G., and Strittmatter,S.M. (2000). Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *J. Cell Biol.* *149*, 411-422.
- Fulop,V. and Jones,D.T. (1999). Beta propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *9*, 715-721.
- Gasman,S., Kalaidzidis,Y., and Zerial,M. (2003). RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat. Cell Biol.* *5*, 195-204.

- Gherardi,E., Love,C.A., Esnouf,R.M., and Jones,E.Y. (2004). The sema domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 669-678.
- Giger,R.J., Urquhart,E.R., Gillespie,S.K., Levensgood,D.V., Ginty,D.D., and Kolodkin,A.L. (1998). Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* *21*, 1079-1092.
- Goodman,C.S. and Shatz,C.J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* *72 Suppl*, 77-98.
- Goshima,Y., Nakamura,F., Strittmatter,P., and Strittmatter,S.M. (1995). Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* *376*, 509-514.
- Govek,E.E., Newey,S.E., and Van Aelst,L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* *19*, 1-49.
- Grunwald,I.C. and Klein,R. (2002). Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 250-259.
- Gu,C., Limberg,B.J., Whitaker,G.B., Perman,B., Leahy,D.J., Rosenbaum,J.S., Ginty,D.D., and Kolodkin,A.L. (2002). Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J. Biol. Chem.* *277*, 18069-18076.
- Gu,C., Yoshida,Y., Livet,J., Reimert,D.V., Mann,F., Merte,J., Henderson,C.E., Jessell,T.M., Kolodkin,A.L., and Ginty,D.D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* *307*, 265-268.
- Guasch,R.M., Scambler,P., Jones,G.E., and Ridley,A.J. (1998). RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol. Cell Biol.* *18*, 4761-4771.
- Hall,A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514.
- He,Z. and Tessier-Lavigne,M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* *90*, 739-751.
- Hynes,R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
- Inatome,R., Tsujimura,T., Hitomi,T., Mitsui,N., Hermann,P., Kuroda,S., Yamamura,H., and Yanagi,S. (2000). Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain. *J. Biol. Chem.* *275*, 27291-27302.
- Ivins,J.K., Yurchenco,P.D., and Lander,A.D. (2000). Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J. Neurosci.* *20*, 6551-6560.
- Jin,Z. and Strittmatter,S.M. (1997). Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* *17*, 6256-6263.
- Journey,W.M., Gallo,G., Letourneau,P.C., and McLoon,S.C. (2002). Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* *22*, 6019-6028.

- Kapfhammer, J.P. and Raper, J.A. (1987). Interactions between growth cones and neurites growing from different neural tissues in culture. *J. Neurosci.* 7, 1595-1600.
- Katoh, H., Harada, A., Mori, K., and Negishi, M. (2002). Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. *Mol. Cell Biol.* 22, 2952-2964.
- Keely, P.J., Rusyn, E.V., Cox, A.D., and Parise, L.V. (1999). R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *J. Cell Biol.* 145, 1077-1088.
- Keynes, R., Tannahill, D., Morgenstern, D.A., Johnson, A.R., Cook, G.M., and Pini, A. (1997). Surround repulsion of spinal sensory axons in higher vertebrate embryos. *Neuron* 18, 889-897.
- Khare, N., Fascetti, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R., and Baumgartner, S. (2000). Expression patterns of two new members of the Semaphorin family in *Drosophila* suggest early functions during embryogenesis. *Mech. Dev.* 91, 393-397.
- Kim, M., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301, 1720-1725.
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.L., and Ginsberg, M.H. (2003). Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 767-776.
- Klostermann, A., Lohrum, M., Adams, R.H., and Puschel, A.W. (1998). The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J. Biol. Chem.* 273, 7326-7331.
- Kobayashi, H., Koppel, A.M., Luo, Y., and Raper, J.A. (1997). A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J. Neurosci.* 17, 8339-8352.
- Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., and Ginty, D.D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.
- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.
- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., O'Connor, T.P., Patel, N.H., Admon, A., Bentley, D., and Goodman, C.S. (1992). Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9, 831-845.
- Koppel, A.M., Feiner, L., Kobayashi, H., and Raper, J.A. (1997). A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron* 19, 531-537.
- Koppel, A.M. and Raper, J.A. (1998). Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J. Biol. Chem.* 273, 15708-15713.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 15, 1942-1952.

- Kuhn,T.B., Brown,M.D., Wilcox,C.L., Raper,J.A., and Bamberg,J.R. (1999). Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of rac1. *J. Neurosci.* *19*, 1965-1975.
- Lee,C.C., Kreusch,A., McMullan,D., Ng,K., and Spraggon,G. (2003). Crystal structure of the human neuropilin-1 b1 domain. *Structure. (Camb.)* *11*, 99-108.
- Leighton,P.A., Mitchell,K.J., Goodrich,L.V., Lu,X., Pinson,K., Scherz,P., Skarnes,W.C., and Tessier-Lavigne,M. (2001). Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* *410*, 174-179.
- Livesey,F.J. (1999). Netrins and netrin receptors. *Cell Mol. Life Sci.* *56*, 62-68.
- Love,C.A., Harlos,K., Mavaddat,N., Davis,S.J., Stuart,D.I., Jones,E.Y., and Esnouf,R.M. (2003). The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 843-848.
- Luo,L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 173-180.
- Luo,Y., Shepherd,I., Li,J., Renzi,M.J., Chang,S., and Raper,J.A. (1995). A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* *14*, 1131-1140.
- Marin,O., Yaron,A., Bagri,A., Tessier-Lavigne,M., and Rubenstein,J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* *293*, 872-875.
- Mark,M.D., Lohrum,M., and Puschel,A.W. (1997). Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins. *Cell Tissue Res.* *290*, 299-306.
- Messersmith,E.K., Leonardo,E.D., Shatz,C.J., Tessier-Lavigne,M., Goodman,C.S., and Kolodkin,A.L. (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* *14*, 949-959.
- Mikule,K., Gatlin,J.C., de la Houssaye,B.A., and Pfenninger,K.H. (2002). Growth cone collapse induced by semaphorin 3A requires 12/15-lipoxygenase. *J. Neurosci.* *22*, 4932-4941.
- Ming,G.L., Wong,S.T., Henley,J., Yuan,X.B., Song,H.J., Spitzer,N.C., and Poo,M.M. (2002). Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* *417*, 411-418.
- Mitsui,N., Inatome,R., Takahashi,S., Goshima,Y., Yamamura,H., and Yanagi,S. (2002). Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *EMBO J.* *21*, 3274-3285.
- Mueller,B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* *22*, 351-388.
- Murakami,Y., Suto,F., Shimizu,M., Shinoda,T., Kameyama,T., and Fujisawa,H. (2001). Differential expression of plexin-A subfamily members in the mouse nervous system. *Dev. Dyn.* *220*, 246-258.
- Nakamura,F., Tanaka,M., Takahashi,T., Kalb,R.G., and Strittmatter,S.M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* *21*, 1093-1100.

- Nishi,M., Takeshima,H., Houtani,T., Nakagawara,K., Noda,T., and Sugimoto,T. (1999). RhoN, a novel small GTP-binding protein expressed predominantly in neurons and hepatic stellate cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *67*, 74-81.
- Nobes,C.D. and Hall,A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* *81*, 53-62.
- Nobes,C.D., Lauritzen,I., Mattei,M.G., Paris,S., Hall,A., and Chardin,P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J. Cell Biol.* *141*, 187-197.
- Oinuma,I., Ishikawa,Y., Katoh,H., and Negishi,M. (2004a). The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* *305*, 862-865.
- Oinuma,I., Katoh,H., Harada,A., and Negishi,M. (2003). Direct interaction of Rnd1 with Plexin-B1 regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho activation by Plexin-B1 and induces cell contraction in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 25671-25677.
- Oinuma,I., Katoh,H., and Negishi,M. (2004b). Molecular dissection of the semaphorin 4D receptor plexin-B1-stimulated R-Ras GTPase-activating protein activity and neurite remodeling in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* *24*, 11473-11480.
- Paoli,M. (2001). Protein folds propelled by diversity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *76*, 103-130.
- Perrot,V., Vazquez-Prado,J., and Gutkind,J.S. (2002). Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J. Biol. Chem.* *277*, 43115-43120.
- Piper,M., Salih,S., Weigl,C., Holt,C.E., and Harris,W.A. (2005). Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nat. Neurosci.* *8*, 179-186.
- Pol,A., Calvo,M., and Enrich,C. (1998). Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett.* *441*, 34-38.
- Polleux,F., Giger,R.J., Ginty,D.D., Kolodkin,A.L., and Ghosh,A. (1998). Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* *282*, 1904-1906.
- Polleux,F., Morrow,T., and Ghosh,A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* *404*, 567-573.
- Puschel,A.W., Adams,R.H., and Betz,H. (1995). Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* *14*, 941-948.
- Raper,J.A. and Kapfhammer,J.P. (1990). The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* *4*, 21-29.
- Renzi,M.J., Feiner,L., Koppel,A.M., and Raper,J.A. (1999). A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1. *J. Neurosci.* *19*, 7870-7880.

- Ridley, A.J. and Hall, A. (1992). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *57*, 661-671.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* *70*, 401-410.
- Rizzo, M.A., Shome, K., Watkins, S.C., and Romero, G. (2000). The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J. Biol. Chem.* *275*, 23911-23918.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* *294*, 1679-1684.
- Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., and Puschel, A.W. (2000a). Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.* *93*, 95-104.
- Rohm, B., Rahim, B., Kleiber, B., Hovatta, I., and Puschel, A.W. (2000b). The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett.* *486*, 68-72.
- Ross, R.A., Spengler, B.A., and Biedler, J.L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* *71*, 741-747.
- Sasaki, Y., Cheng, C., Uchida, Y., Nakajima, O., Ohshima, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Kishida, R., Kudo, Y., Ohno, S., Nakamura, F., and Goshima, Y. (2002). Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron* *35*, 907-920.
- Schwarting, G.A., Kostek, C., Ahmad, N., Dibble, C., Pays, L., and Puschel, A.W. (2000). Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J. Neurosci.* *20*, 7691-7697.
- Semaphorin Nomenclature Committee (1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell* *97*, 551-552.
- Serini, G., Valdembri, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zammataro, L., Primo, L., Tamagnone, L., Logan, M., Tessier-Lavigne, M., Taniguchi, M., Puschel, A.W., and Bussolino, F. (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* *424*, 391-397.
- Shepherd, I.T. and Raper, J.A. (1999). Collapsin-1/semaphorin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons. *Dev. Biol.* *212*, 42-53.
- Shirvan, A., Kimron, M., Holdengreber, V., Ziv, I., Ben Shaul, Y., Melamed, S., Melamed, E., Barzilai, A., and Solomon, A.S. (2002). Anti-semaphorin 3A antibodies rescue retinal ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy. *J. Biol. Chem.* *277*, 49799-49807.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* *379*, 369-374.
- Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. (1998). Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* *281*, 1515-1518.

- Sorkin,A. and Von Zastrow,M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 600-614.
- Sprague,E.R., Redd,M.J., Johnson,A.D., and Wolberger,C. (2000). Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J.* 19, 3016-3027.
- Springer,T.A. (2002). Predicted and experimental structures of integrins and beta-propellers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 802-813.
- Stamos,J., Lazarus,R.A., Yao,X., Kirchhofer,D., and Wiesmann,C. (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *EMBO J.* 23, 2325-2335.
- Swiercz,J.M., Kuner,R., Behrens,J., and Offermanns,S. (2002). Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* 35, 51-63.
- Takagi,J., Petre,B.M., Walz,T., and Springer,T.A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599-11.
- Takahashi,T., Fournier,A., Nakamura,F., Wang,L.H., Murakami,Y., Kalb,R.G., Fujisawa,H., and Strittmatter,S.M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59-69.
- Takahashi,T. and Strittmatter,S.M. (2001). Plexina1 autoinhibition by the plexin sema domain. *Neuron* 29, 429-439.
- Tamagnone,L., Artigiani,S., Chen,H., He,Z., Ming,G.I., Song,H., Chedotal,A., Winberg,M.L., Goodman,C.S., Poo,M., Tessier-Lavigne,M., and Comoglio,P.M. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80.
- 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, 519-530.
- Terman,J.R., Mao,T., Pasterkamp,R.J., Yu,H.H., and Kolodkin,A.L. (2002). MICALS, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* 109, 887-900.
- Tessier-Lavigne,M. and Goodman,C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- Toyofuku,T., Zhang,H., Kumanogoh,A., Takegahara,N., Suto,F., Kamei,J., Aoki,K., Yabuki,M., Hori,M., Fujisawa,H., and Kikutani,H. (2004). Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 18, 435-447.
- Turner,L.J., Nicholls,S., and Hall,A. (2004). The activity of the plexin-A1 receptor is regulated by Rac. *J. Biol. Chem.* 279, 33199-33205.

- Uchida,Y., Ohshima,T., Sasaki,Y., Suzuki,H., Yanai,S., Yamashita,N., Nakamura,F., Takei,K., Ihara,Y., Mikoshiba,K., Kolattukudy,P., Honnorat,J., and Goshima,Y. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells* 10, 165-179.
- Ulupinar,E., Datwani,A., Behar,O., Fujisawa,H., and Erzurumlu,R. (1999). Role of semaphorin III in the developing rodent trigeminal system. *Mol. Cell Neurosci.* 13, 281-292.
- Van Aelst,L. and D'Souza-Schorey,C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.
- Varela-Echavarria,A., Tucker,A., Puschel,A.W., and Guthrie,S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18, 193-207.
- Varghese,J.N., Laver,W.G., and Colman,P.M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 303, 35-40.
- Vastrik,I., Eickholt,B.J., Walsh,F.S., Ridley,A., and Doherty,P. (1999). Sema3A-induced growth-cone collapse is mediated by Rac1 amino acids 17-32. *Curr. Biol.* 9, 991-998.
- Vieira,A.V., Lamaze,C., and Schmid,S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274, 2086-2089.
- Vikis,H.G., Li,W., and Guan,K.L. (2002). The plexin-B1/Rac interaction inhibits PAK activation and enhances Sema4D ligand binding. *Genes Dev.* 16, 836-845.
- Vikis,H.G., Li,W., He,Z., and Guan,K.L. (2000). The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12457-12462.
- White,F.A. and Behar,O. (2000). The development and subsequent elimination of aberrant peripheral axon projections in Semaphorin3A null mutant mice. *Dev. Biol.* 225, 79-86.
- Winberg,M.L., Noordermeer,J.N., Tamagnone,L., Comoglio,P.M., Spriggs,M.K., Tessier-Lavigne,M., and Goodman,C.S. (1998). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95, 903-916.
- Wittinghofer,A., Scheffzek,K., and Ahmadian,M.R. (1997). The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett.* 410, 63-67.
- Xiong,J.P., Stehle,T., Diefenbach,B., Zhang,R., Dunker,R., Scott,D.L., Joachimiak,A., Goodman,S.L., and Arnaout,M.A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294, 339-345.
- Yamamoto,S., Suzuki,H., Nakamura,M., and Ishimura,K. (1999). Arachidonate 12-lipoxygenase isozymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447, 37-44.
- Yaron,A., Huang,P.H., Cheng,H.J., and Tessier-Lavigne,M. (2005). Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron* 45, 513-523.

Yu, T.W. and Bargmann, C.I. (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci.* 4 *Suppl*, 1169-1176.

Zanata, S.M., Hovatta, I., Rohm, B., and Puschel, A.W. (2002). Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J. Neurosci.* 22, 471-477.

Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C., and Ruoslahti, E. (1996). Integrin activation by R-ras. *Cell* 85, 61-69.

