

Fach Zellbiologie/Genetik

Genetische und biochemische Ansätze zur
funktionellen Analyse von Semaphorinen

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

vorgelegt von
Constanze Burkhardt
aus Leverkusen

2003

Dekan:

Erster Gutachter: Prof. Dr. Andreas W. Püschel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Christian Klämbt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2003

Tag der Promotion: 02.06.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Molekulare Mechanismen der axonalen Wegfindung.....	2
1.2 Molekulare Mechanismen der Zellmigration.....	4
1.3 Die Semaphorine	5
1.3.1 Die Proteinfamilie der Semaphorine.....	5
1.3.2 Die Funktion von Semaphorinen in der Entwicklung des Nervensystems.....	7
1.3.3 Semaphorin-Rezeptoren.....	8
1.3.4 Signaltransduktions-Kaskaden der Semaphorin-Rezeptoren	10
1.4 Das olfaktorische System.....	11
1.4.1 Die funktionelle Architektur des olfaktorischen Systems.....	11
1.4.2 Axonale Zielfindung im olfaktorischen System.....	13
1.5 Die Funktion von Nrp-1 im vaskulären System.....	14
1.5.1 Die Entwicklung des Blutgefäßsystems.....	14
1.5.2 Regulation der Entwicklung des vaskulären Systems	15
1.5.3 Die Funktion der Semaphorine im vaskulären System.....	16
1.6 Ansätze zur Analyse von Semaphorinen der Klasse 4	17
1.6.1 PDZ-Domänen Proteine in postsynaptischen Spezialisierungen	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Materialien.....	21
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Chemikalien.....	22
2.1.3 Medien und Antibiotikallösungen für Bakterienkulturen	22
2.1.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur	23
2.1.5 Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	24
2.1.6 Material für molekularbiologische Methoden.....	28
2.1.7 Lösungen für biochemische Methoden.....	28
2.1.7.1 Puffer für die Herstellung von Proteinlysaten.....	28
2.1.7.2 Puffer für den <i>GST-Pulldown</i> -Assay.....	29
2.1.7.3 Puffer zur Kultivierung, Expression und Lysis rekombinanter Proteine	29
2.1.7.4 Puffer zur Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	30

2.1.7.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.1.7.6	Western Transfer	31
2.1.7.7	Nachweis von Proteinen	31
2.1.8	Material für biochemische Methoden	32
2.1.9	Material und Lösungen für Immunhistochemie	32
2.1.10	Bakterienstämme	34
2.1.11	Phagen.....	34
2.1.12	BAC	34
2.1.13	Zelllinien	34
2.1.14	Mausstämme.....	35
2.1.15	Rattenstämme	35
2.1.16	Plasmide und Expressionkonstrukte	35
2.1.17	Synthetische Oligonukleotide.....	37
2.1.18	Antikörper	38
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.1	Präparative Methoden	39
2.2.1.1	Isolierung von DNA durch alkalische Lyse.....	39
2.2.1.2	Isolierung von DNA über QIAwell-Säulen	40
2.2.1.3	Isolierung von DNA im präparativen Maßstab.....	40
2.2.1.4	Präparation von genomischer DNA	41
2.2.1.5	Präparation von BAC-DNA	41
2.2.1.6	Präparation von Phagen-DNA	41
2.2.1.7	Polymerasekettenreaktion.....	42
2.2.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten.....	42
2.2.1.9	Phenol-Extraktion von DNA.....	43
2.2.1.10	Reinigung und Konzentration von DNA aus wässrigen Lösungen.....	43
2.2.2	Analytische Methoden	43
2.2.2.1	DNA-Restriktionsverdau	43
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	44
2.2.2.4	Nukleinsäuretransfer.....	44
2.2.2.5	Herstellung von radioaktiv markierten Sonden und Hybridisierung.....	45
2.2.2.6	DNA-Sequenzierung	45
2.2.3	Klonierungstechniken	46
2.2.3.1	Dephosphorylierung von DNA	46
2.2.3.2	Phosphorylierung und Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden (, <i>fill in</i> ')	46
2.2.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten	46

2.2.3.4	Kultivierung von Bakterien.....	46
2.2.3.5	Herstellung von kompetenten Zellen für die Elektroporation	47
2.2.3.6	Herstellung von kompetenten Bakterien für die Hitzeschocktransformation	47
2.2.3.7	Transformation durch Elektroporation	47
2.2.3.8	Transformation durch Hitzeschock.....	48
2.2.4	Konstruktion von Sema4B Deletionsmutanten	48
2.2.5	Generierung des <i>Sema4g</i> Targeting-Vektors	49
2.3	Proteinbiochemie	51
2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	51
2.3.2	Aufreinigung von Zellmembranen über einen Sucrose-Gradienten.....	51
2.3.3	Kultivierung und Expression rekombinanter Proteine.....	52
2.3.4	Aufschluß von Bakterienzellen	52
2.3.5	Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose	52
2.3.6	<i>Pulldown</i> -Assay.....	53
2.3.7	Aufreinigung von His-gekoppelten bakteriell exprimierten Proteinen.....	53
2.3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
2.3.9	Immunpräzipitation.....	54
2.3.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	54
2.3.11	Western-Blot (<i>semi-dry</i> -Blot).....	55
2.3.12	Immundetektion von Proteinen	55
2.4	Zellkultur	57
2.4.1	Auftauen von Zellen	57
2.4.2	Kultivieren von Zellen	57
2.4.3	Kryokonservierung von Zellen.....	58
2.4.4	Transfektion von Zellen.....	58
2.4.4.1	Calciumphosphat-vermittelte Transfektion	58
2.4.4.2	Lipofektion mit FuGene6.....	59
2.5	Indirekte Immunfluoreszenz.....	59
2.5.1	Immunologischer Nachweis rekombinanter Proteine in Cos-7 Zellen.....	59
2.5.2	Immunologischer Nachweis rekombinanter und endogener Proteine in primären hippocampalen Neuronen.....	60
2.5.3	Immunologischer Nachweis von Proteine auf histologischen Schnitten.....	60
2.6	Immunhistochemie	62
2.6.1	<i>Whole Mount</i> -Färbung von Embryonen.....	62
2.6.2	Histologischer Nachweis endogener Proteine auf Schnitten	62
2.6.3	<i>Whole Mount-lacZ</i> -Färbung vom <i>Bulbus olfactorius</i>	63
2.7	Tierversuche	63

2.7.1	Tierhaltung	63
2.7.2	Perfusion	63
2.7.3	Immunisierung von Kaninchen	63
3	Ergebnisse	65
3.1	Genetische Analyse des sekretierten Semaphorins Sema3A	65
3.1.1	Rückkreuzung der <i>Sema3a</i> Mauslinie in den CD1 Hintergrund	65
3.1.2	Neuropilin-1 ⁺ Axone sind in <i>Sema3a</i> Mutanten fehlgeleitet	66
3.1.3	Analyse der Projektion von OR37A ⁺ olfaktorischen Neuronen in <i>Sema3a</i> Mutanten	69
3.1.4	Vaskuläre Defekte in <i>Sema3a</i> Mutanten.....	71
3.2	Biochemische und funktionelle Analyse der Semaphorine der Klasse 4	74
3.2.1	Biochemischer Nachweis der Interaktion von Klasse 4 Semaphorinen mit PDZ-Domänen Proteinen	74
3.2.2	PSD-95 induziert die Klusterbildung von Sema4B, Sema4C und Sema4G in Cos-7 Zellen	76
3.2.3	Sema4B bindet die PDZ-Domänen von PSD-95.....	77
3.2.4	Generierung von Sema4B Deletionsmutanten	79
3.2.5	Der C-Terminus von Sema4B vermittelt die Bindung von PSD-95 in Cos-7 Zellen	81
3.2.6	Generierung und Charakterisierung des α -Sema4B_09 Antikörpers.....	83
3.2.7	Die Expression von Sema4B in neuronalen Geweben	85
3.2.8	PSD-95 und Sema4B interagieren <i>in vivo</i>	86
3.2.9	Sema4B kolokalisiert mit postsynaptischen Markern in hippocampalen Neuronen	88
3.2.10	Interaktion von Sema4B und PSD-95 nach Kotransfektion hippocampaler Neurone	90
3.2.11	Sema4B Überexpression verändert nicht die Zahl NR-1 ⁺ Synapsen	92
3.3	Ansätze zur genetischen Analyse von Semaphorinen der Klasse 4.....	95
3.3.1	Genomische Organisation von Sema4B und Sema4G	95
3.3.2	Herstellung eines Targeting-Vektors zur Generierung von <i>Sema4g</i> Mutanten	97
4	Diskussion	101
4.1	Genetische Analyse von Sema3A	101
4.1.1	Sema3A wirkt als repulsives Signalmolekül im olfaktorischen System	102
4.1.2	Sema3A beeinflusst die Projektion von OR37A ⁺ Axonen im BO	103
4.1.3	Mögliche physiologische Funktion von Sema3A in der Organisation des	

olfaktorischen Systems	105
4.1.4 Die Rolle von Sema3A während der Entwicklung des Blutgefäßsystems .	106
4.1.5 Axonale Wegfindung und Blutgefäßentwicklung: zwei miteinander verbundene Prozesse.....	108
4.1.6 Ausblick	109
4.2 Biochemische Analyse des membranständigen Sema4B	111
4.2.1 Interaktion von Klasse 4 Semaphorinen mit PDZ-Domänen Proteinen	111
4.2.2 Funktion der Interaktion von Sema4B mit PSD-95.....	113
4.2.3 Ausblick	115
5 Zusammenfassung	117
6 Literaturverzeichnis	119
7 Anhang.....	141

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpeoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Basen
bp	Basenpaar(e)
bidest.	doppelt destilliert
BO	<i>Bulbus olfactorius</i>
BSA	Rinder Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	desoxy-
dd	didesoxy-
Da	Dalton
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteri
f.c.	Endkonzentration
Fa.	Firma
FCS	Fötale Kälberserum
GPI	Glykosylposphatidylinositol
h	Stunde
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
kD	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
μ	Mikro
m	Mili
M	Molar
min	Minute
mol	Mol

mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
n	Nano
N	Normal
Nrp	Neuropilin
NTP	Nukleotidtriphosphate
OE	olfaktorisches Riechepithel
OR	Geruchsrezeptor
OSN	olfaktorische sensorisches Neuron
P	postnatal
p.A.	Pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCI	Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1), (v/v/v)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units (plaquebildende Einheiten)
pH	potentium hydrogenii
Plx	Plexin
PNS	peripheres Nervensystem
PSD	postsynaptische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecylsulfat (Natriumdodekylsulfat)
Tab.	Tabelle
TE	Tris-HCl/EDTA-Lösung
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
ÜN	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	volume to volume (Volumen/Volumen)
WT	Wildtyp
(w/v)	weigh to volume (Gewicht/Volumen)
(w/w)	weight to weight (Gewicht/Gewicht)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Aminosäuren wurden mit dem international gebräuchlichen Ein- bzw. Dreibuchstabenkode abgekürzt.

1 Einleitung

Im Altertum wurden Nerven als Gänge angesehen, die eine vom Gehirn sezernierte Flüssigkeit in die Peripherie weiterleiten. Die zelluläre Struktur des Nervensystems wurde erst im Zuge der sich entwickelnden Zellenlehre (Schleiden, 1842; Schwann, 1839) erkannt. Golgi (1885) ermöglichte durch seine Färbemethode eine detaillierte Beschreibung von Neuronen und deren Kontaktstellen („Synapsen“, Sherrington um 1900). Dies führte schließlich zur Neuronentheorie, wonach Neuronen die fundamentale Übertragungseinheit im Nervensystem sind. Heute ist klar, daß über 10^{14} Synapsen die etwa 10^{11} Nervenzellen des menschlichen Gehirns verschalten. Für die Funktionsfähigkeit dieses Systems müssen diese Verbindungen korrekt geknüpft werden. Diese Verknüpfung erfolgt nach einem genauen Muster und kann in unterschiedliche Abschnitte eingeteilt werden. Nachdem in der frühen Entwicklung des ZNS die Neurone ihre Positionen eingenommen haben, senden sie gezielt Axone in ihre Zielgebiete. Dort bildet sich durch eine aktivitätsabhängige Verfeinerung das adulte Schaltmuster.

Um ihre Ziele korrekt zu innervieren, besitzen Axone eine sehr flexible und sensitive Struktur an ihrer Spitze, die Ramon y Cajal schon 1890 in Hühnerembryonen identifizierte und als Wachstumskegel bezeichnete. Ramon y Cajal vermutete, daß der Wachstumskegel durch chemische Substanzen geleitet wird, die Natur dieser Substanzen war allerdings zunächst unklar. Anfangs herrschte die Meinung vor, daß auswachsende Axone ungerichtet geleitet werden, und daß die Schaltmuster der Neuronen allein aufgrund von Stimulation, die der Organismus durch seine Umwelt erhält, definiert wird. In späteren Untersuchungen wurde jedoch klar, daß chemotaktische Mechanismen der Spezifität neuronaler Projektionen zugrunde liegen (Sperry, 1963). Nach Untersuchungen an der Retina von Amphibien postulierte Sperry, daß eine komplementäre Chemoaffinität die gezielte Verbindung von Axonen zu ihrem Zielgebiet ermöglicht. Dabei erfolgt die Projektion der Axone nicht zufällig, sondern wird durch Faktoren auf dem Wachstumskegel, entlang der Wegstrecke und auf den Zielzellen gesteuert. Jedoch konnte von Fawcett und Leary (1985) gezeigt werden, daß zusätzlich synaptische Verbindungen in der Retina in Abhängigkeit von ihrer Aktivität auch neu organisiert werden können. Es können demnach zwei Mechanismen unterschieden werden, die die Entwicklung neuronaler Schaltkreise steuern. Zunächst wird ein Grundmuster axonaler Projektionen durch einen aktivitätstunabhängigen, genetisch festgelegten Steuerungsmechanismus festgelegt. Anschließend wirken aktivitätsabhängige Mechanismen, die meist an späteren Vorgängen der Entwicklung von Synapsen und der Verfeinerung von Projektionsmustern beteiligt sind (Goodmann und Shatz, 1993; Tessier-Lavigne und Goodmann, 1996; Mueller, 1999).

Sind einzelne Projektionen von Pionier-Axonon erst einmal festgelegt, so folgt die Mehr-

zahl der später auswachsenden Axone diesen Wegen (Harrison, 1910). Das Auswachsen der Pionieraxone wird teilweise durch Zellen, die als Wegweiser dienen, (*Guidepost cells*) kontrolliert. *Guidepost cells* werden von den wachsenden Axonen kontaktiert und dienen als Navigationssignale entlang des Weges von Axonen (Bentley und Keshishian, 1982; Ho und Goodman, 1982). Dabei sind nachwachsende Axone beim Fehlen von bestimmten Pionier-Axonen in ihrem Wachstum verzögert und zeigen eine höhere Fehlerquote in der Zielfindung, die jedoch im Nachfolgenden korrigiert werden kann. Daraus läßt sich schließen, daß Pionier-Axone zwar das Wachstum erleichtern, jedoch nicht essentiell für die Projektion von Axonen sind (Lin et al., 1995). Wachstumskegel haben demnach eine essentielle Funktion während der Navigation von Axonen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß Wachstumskegel zwei Arten von Zytoskelett-Elementen enthalten. Dabei sind in der zentralen Region des Wachstumskegels Mikrotubuli lokalisiert, die bis in die Filopodien der Spitze des Wachstumskegel hineinreichen können. Desweiteren sind in der peripheren Domäne des Wachstumskegel hauptsächlich Aktin-Filamente nachweisbar, die mit Filopodienbündel und Lamellipoden ein Netzwerk bilden, und so die Dynamik und Beweglichkeit des Wachstumskegel gewährleisten (Gordon-Weeks und Mansfield, 1996; Tanaka und Sabry, 1995; Ridley et al., 2000; Nobes und Hall, 2001).

1.1 Molekulare Mechanismen der axonalen Wegfindung

Um ihre Zielregionen zu erreichen, benötigen auswachsende Axone neben einer für ihr Wachstum förderlichen Mikroumgebung eine Vielzahl von Signalen. Dabei kann die Art der Signalwirkung in Chemorepulsion, Chemoattraktion, Kontakt-abhängige Repulsion oder Kontakt-abhängige Attraktion unterteilt werden (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Müller, 1999; Dickson, 2002; Abb. 1). Diese unterschiedlichen Mechanismen werden durch permissiv oder instruktiv wirkende Proteine vermittelt. Die Grundlage einer geeigneten Mikroumgebung für auswachsende Axone ist ein permissives Signal. Proteine, wie z.B. das Neuronale Zelladhäsions-Molekül (*neuronal cell adhesion molecule*, N-CAM), N-Cadherin oder Laminin, sind sowohl auf der Oberfläche von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen als auch in der extrazellulären Matrix lokalisiert und stimulieren das axonale Wachstum (Rathjen und Jessel, 1991). Instruktive Signale hingegen vermitteln die Richtungsinformation für auswachsende Axone. Dabei können sie in einem Konzentrationsgradienten wirken, der die entscheidende Information für das gezielte Auswachsen von Axonen enthält. Die Axone richten sich hierbei nach der Richtung und der Steigung des Gradienten, nicht jedoch nach der

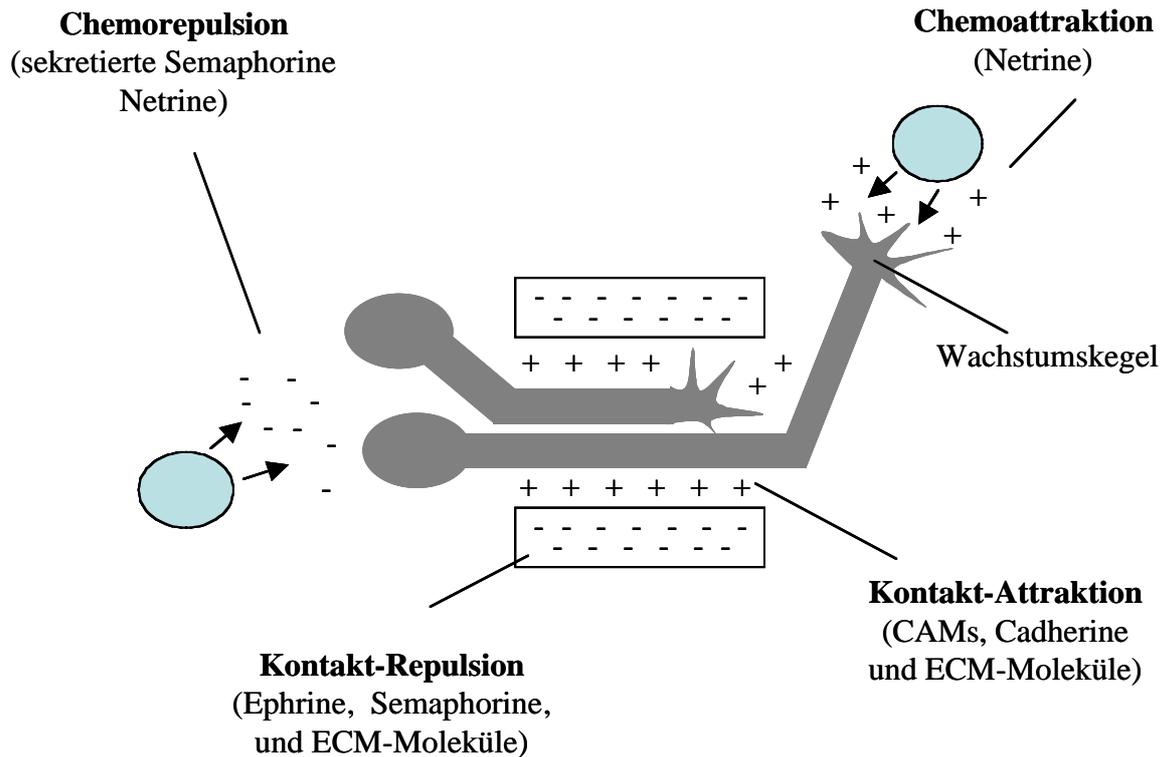


Abb. 1: Vier verschiedene Signalmechanismen lenken das axonale Wachstum. Kontakt-Attraktion, Chemoattraktion, Kontakt-Repulsion und Chemorepulsion lenken die Navigation von Axonen. Die repulsiven Signale sind mit einem Minuszeichen und attraktive Signale mit einem Pluszeichen dargestellt. Für jeden Mechanismus sind Beispiele von Liganden genannt, die diese vermitteln. CAM: *Cell-adhesion molecule*; ECM: *extra-cellular matrix* (modifiziert nach Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

absoluten Konzentration der Signalmoleküle. Dabei können lösliche, chemoattraktive Stoffe die Wachstumsrichtung von Axonen beeinflussen. Jedoch können auch repulsiv oder inhibierend wirkende Moleküle die Orientierung von auswachsenden Neuriten steuern. Dabei können Axone durch Ausschluß aus bestimmten Regionen wie durch einen Korridor gelenkt werden, oder das Eindringen von Axonen in bestimmte Regionen verhindert werden (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Caroni und Schwab, 1988; Stahl et al., 1990; Raper und Kapfhammer, 1990; Keynes et al., 1991).

In den letzten Jahren konnten vier Proteinfamilien identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle bei der axonalen Wegfindung spielen: die Netrine, die Ephrine, die Slit-Proteine und die Semaphorine. Alle vier Proteinfamilien sind evolutionär von Nematoden bis zum Mensch konserviert und üben häufig eine ähnliche Funktion während der Wegfindung von Axonen aus.

Die Wirkung von Signalen der axonalen Wegfindung ist zelltypabhängig. So sind Netrine oder sekretierte Semaphorine bifunktionelle Proteine, die sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken können. Ihre Wirkung ist von der Expression der jeweiligen Rezeptoren abhängig. Dabei hängt ihre attraktive und repulsive Wirkung nicht nur allein von der Expression des jeweiligen Rezeptors ab (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996), sondern auch von der intra-

zellulären Konzentration zyklischer Nukleotide (cGMP oder cAMP) im Wachstumskegel (Ming et al., 1999; Song et al., 1997). Die Funktion dieser Moleküle ist jedoch nicht nur auf das Auswachsen von Axonen beschränkt. Sie erfüllen zum Teil auch noch andere Aufgaben, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.2 Molekulare Mechanismen der Zellmigration

Die Migration von Zellen ist ein essentieller Vorgang bei der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems. Das periphere Nervensystem (PNS) wird von Neuralleistenzellen gebildet, die aus der dorsalen Region des Neuralrohrs auswandern (Park et al., 2002). Im zentralen Nervensystem (ZNS) entspringen neuronale Vorläuferzellen in der Ventrikularzone und wandern auf zwei unterschiedliche Weisen in andere Schichten des ZNS, häufig in radialer Migration entlang von Gliazellen. So bilden die Vorläufer der Pyramidenzellen des Cerebellums aus der Ventrikularzone entlang an Gliazellen die Schichten des Cortex. Ebenso wandern Purkinjezellen entlang der Radialglia zur Oberfläche des Neuroepithels des cerebellären Primordiums. Neuronen können auch durch tangentielle Migration parallel zur Oberfläche des Gehirns wandern (Rakic, 1990; Hatten, 1999), wobei sie keine Gliazellen benötigen. So wird ein großer Teil der Interneuronen wie der GABAergen Neurone des Telencephalons von tangential migrierenden Neuronen gebildet.

Es konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß die Zellmigration durch Signale gesteuert wird, die auch während der axonalen Wegfindung eine Rolle spielen. Das erste Molekül, für das ein direkter Einfluß auf die Zellmigration gezeigt wurde, ist das sezernierte Protein Slit (Wu et al., 1999). Slit wurde zunächst als repulsives Signal identifiziert, das kommissurale Neurone am Überqueren der Mittellinie des Neuralrohr hindert (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Li et al., 1999). Eine Rolle von Slit in der Zellmigration wurde zunächst im olfaktorischen System beschrieben. Die Interneurone des *Bulbus olfactorius* (BO) werden von Vorläuferzellen gebildet, die in der rostralen Region entspringen und in die anteriore subventrikuläre Zone (SVZa) einwachsen. Slit hat einen repulsiven Effekt auf Zellen der SVZa (Lois et al., 1994; Wu et al., 1999). Auch für andere Proteinfamilien, die während der axonalen Wegfindung eine Rolle spielen, konnte *in vitro* und *in vivo* ein direkter Einfluß auf die Zellmigration nachgewiesen werden (Tab. 1).

Ligand	Rezeptor	Funktion in neuronaler Migration	Referenz
Slit	Robo	Migration von Zellen der SVZa	Wu et al., 1999 Zhu et al., 1999
Netrin	DCC Unc-5h	Attraktiver Effekt auf cerebellare Neurone Repulsiver Effekt auf <i>granule cells</i> des Cerebellums	Yi et al., 1999 Serafini et al., 1996 Murase et al., 2002 Alcantara et al., 2000
Semaphorin	Nrp-1 Plexin	Migration von GABAergen Interneuronen im Striatum	Hamasaki et al., 2001
Ephrin	Eph	Migration von postnatalen Zellen der SVZa	Marin et al., 2001

Tab. 1: Moleküle der axonalen Wegfindung, die auch in dem Prozeß der Zellmigration involviert sind (modifiziert nach Park et al., 2002).

Demnach sind Zellmigration und axonale Wegfindung zwei eng miteinander verwandte Prozesse, die durch die gleichen Signale und intrazellulären Mechanismen gesteuert werden (Allen et al., 1998; Weiner 2002; Wong et al., 2002). Die Zellmigration spielt jedoch nicht nur bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle, sondern auch bei der Differenzierung anderer Gewebe, wie z.B. des Blutgefäßsystems (s. 1.5.1)

1.3 Die Semaphorine

1.3.1 Die Proteinfamilie der Semaphorine

Eine der größten Proteinfamilien, die sowohl die axonale Wegfindung als auch die Zellmigration steuern, sind die Semaphorine. Das erste molekular charakterisierte chemorepulsiv-wirkende Protein war Sema3A (ursprünglich Collapsin 1 genannt), das in Membranpräparationen von embryonalem oder adulten Gehirnen von Hühnern identifiziert wurde (Kapfhammer und Raper, 1987; Raper und Kapfhammer, 1990; Luo et al., 1995). In einem Wachstumskegel Kollaps-Assay war Sema3A in der Lage, den Kollaps sensorischer Axone zu induzieren. Mit Hilfe dieses Assays konnte Sema3A biochemisch isoliert und die entsprechende cDNA kloniert werden. Sema3A zeigte eine große Homologie zu Fascilin IV (später in Sema1a umbenannt), einem Gen, das in einem Screen nach Oberflächenproteinen im zentralen Nervensys-

tem der Heuschrecke identifiziert wurde (Kolodkin et al., 1992; Kolodkin et al., 1993). Sema3A/Collapsin 1 und Sema1a/FascilinIV waren die ersten Mitglieder einer großen Proteinfamilie, die alle eine konservierte Domäne von 500 Aminosäuren (Sema-Domäne) enthalten (Kolodkin et al., 1993; Messersmith et al., 1995; Püschel et al., 1995). Diese Sema-Domäne enthält neben konservierten Sequenzmotiven 14 hochkonservierte Cystein-Reste und eine potentielle N- Glykolisierungsstelle.

Mehr als 30 Semaphorine konnten bisher identifiziert werden, die anhand der Sequenzhomologien ihrer Sema-Domäne und einem Klasse-spezifischen C-Terminus in 8 Klassen unterteilt werden können (Mark et al., 1997; Semaphorin Nomenclature Committee, 1999; Abb. 2). Die Klassen 1 und 2 werden allein in

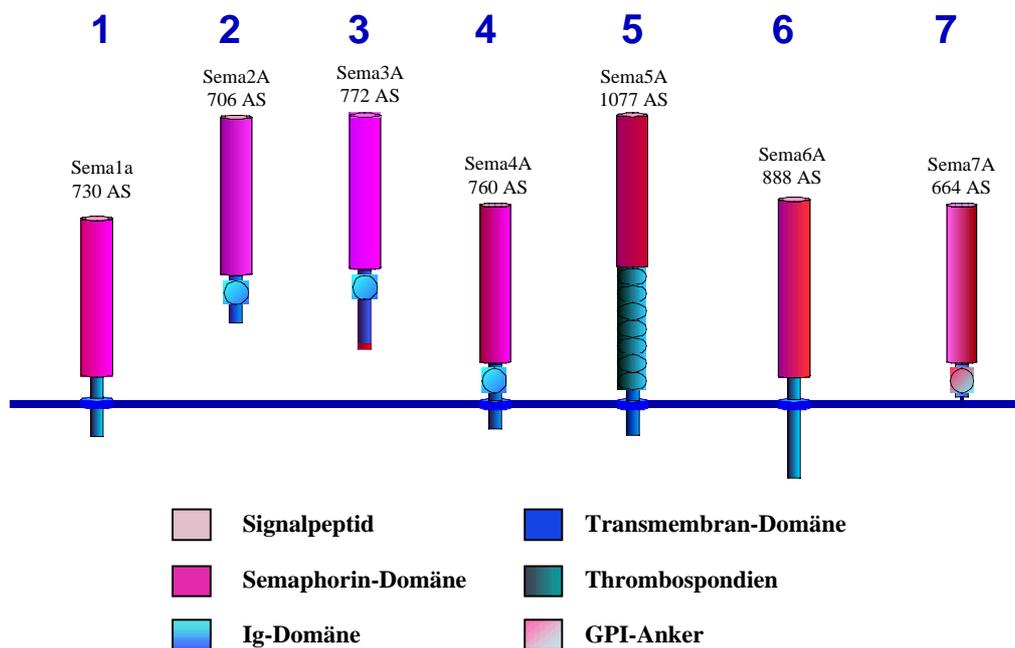


Abb. 2: Die Semaphorin-Familie. Schematische Darstellung der sieben unterschiedlichen Semaphorinklassen. In *D. melanogaster* konnten 5 Mitglieder identifiziert werden (Klasse 1, 2 und 5), in *C. elegans* 3 Mitglieder (Klasse 1 und 2), und in Vertebraten 20 Mitglieder (Klasse 3-7). Es ist jeweils ein Semaphorin stellvertretend für die entsprechende Klasse dargestellt. (AS: Aminosäure; GPI: Glycosylphosphatidylinositol). (Fiore und Püschel, 2003).

Invertebraten gefunden, während die Klassen 3 bis 7 in Vertebraten repräsentiert sind. Die Klasse V enthält virale Semaphorine. Die Semaphorin-Familie beinhaltet sowohl sezernierte (Klasse 2 und 3) als auch membranständige Mitglieder, die durch eine Transmembran-domäne (Klasse 1, 4, 5 und 6) oder mit einem GPI-Anker (Klasse 7) in der Plasmamembran verankert sind (Fiore und Püschel, 2003; Abb. 2). Die extrazelluläre Domäne der meisten Semaphorine beinhaltet eine Ig-ähnliche Domäne (Klassen 2-4 und 7), auf die ein Klassen-spezifischer C-Terminus folgt. Für die Klasse 5 Semaphorine sind sieben Typ-1 Thrombospondin Kassetten typisch, die auch im extrazellulären Matrix Protein Thrombospondin-1 und -2 gefunden werden (Adams et al., 1996).

Aufgrund ihres räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters ist es wahrscheinlich, daß

Semaphorine als Navigationssignale für auswachsende Axone fungieren können. Eine Expressionsanalyse mittels *in situ*-Hybridisierung zeigt sehr unterschiedliche Verteilungen der mRNAs von Semaphorinen der Klasse 3 bis 5 (Püschel et al., 1995; Adams et al., 1996). Transkripte verschiedener Semaphorine sind bereits in E9,5 Embryonen nachweisbar und bleiben auch nach der Geburt detektierbar (Püschel et al., 1995). *Sema3a* mRNA befindet sich nur in bestimmten Regionen des Nervensystems, während *Sema4a* und *Sema4b* gleichmäßig im gesamten Gehirn exprimiert werden.

Allen Mitgliedern ist jedoch gemein, daß ihre Expression nicht auf das Gehirn beschränkt ist. Wahrscheinlich spielen die Semaphorine auch eine Rolle während der Angiogenese (Dissertation von Roberto Fiore, Frankfurt, 2003; Yamada et al., 1997; Brambilla et al., 2000; Tamagone und Comoglio et al., 2002) und in der Immunabwehr. So konnte für Sema4D gezeigt werden, daß es auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird und an der Aggregation und Aktivierung von B-Zellen beteiligt ist (Kumanogoh et al., 2002).

1.3.2 Die Funktion von Semaphorinen in der Entwicklung des Nervensystems

Die physiologische Funktion der Semaphorine ist am besten in der Entwicklung des Nervensystems untersucht, wo sie an der Steuerung und Wegfindung von Axonen und Dendriten, der axonalen Faszikulation und der Zellmigration beteiligt sind. *In vitro* wirkt Sema3A als repulsives Signal u.a. auf sensorische Axone (Koppel et al., 1998; Adams et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Rabacchi et al., 1999; Bagnard et al., 1998; Chedotal et al., 1998; Steup et al., 1999). Ähnliche Effekte konnten auch für andere Mitglieder der Klasse 3 Semaphorine *in vitro* beobachtet werden (Adams et al., 1997; Chedotal et al., 1998; Steup et al., 1999). Jedoch konnten oft keine dieser starken *in vitro* Effekte entsprechenden Phänotypen in *Sema3a* Mausmutanten nachgewiesen werden. Für *Sema3a* wurden zwei unabhängige Mausmutanten generiert (Behar et al., 1996; Taniguchi et al., 1997). Die Analysen dieser Mutanten war bisher auf embryonale und neonatale Stadien beschränkt, da *Sema3a*^{-/-} Mäuse kurz nach der Geburt sterben. Der Vergleich der beiden Mauslinien zeigte, daß der genetische Hintergrund der Mäuse einen großen Einfluß auf die Art und Stärke des Phänotyps hat (Taniguchi et al., 1997; Taniguchi et al., 2003). Im ZNS von *Sema3a* Mutanten waren keine dramatischen Defekte nachweisbar. Im peripheren Nervensystem (PNS) wurde eine starke Defaszikulierung sensorischer Axone in den Mutanten festgestellt, allerdings ohne daß die Projektion der Axone zu ihren Zielgebieten verändert war (Taniguchi et al., 1997). Demnach scheint *in vivo* Sema3A nicht als chemorepulsives Signal für sensorische Axone zu wirken, sondern deren Faszikulierung durch einen als Umgebungsrepulsion bezeichneten Effekt zu vermitteln (Keynes et al., 1997).

Zusammenfassend bestätigt der Phänotyp der *Sema3a* Mutanten, daß Axone von einer Vielzahl von Signalen geleitet werden, die teilweise redundante Funktionen haben. Die Eliminierung einzelner Signale führt zu einer erhöhten Fehlerrate in der Projektion von Axonen, jedoch nicht zu einer vollständigen Blockierung der Entwicklung des Nervensystems.

Sema3A ist ein bifunktionelles Signal, das einen attraktiven Effekt auf die Dendriten der Pyramidenzellen des Kortex und einen repulsiven Effekt auf deren Axone hat (Polleux et al., 1998; Polleux et al., 2000). Es wird vermutet, daß die intrazelluläre cGMP-Konzentration für die gegensätzliche Reaktion verantwortlich ist, da die lösliche Guanylat-Zyklase in den Dendriten konzentriert ist. *In vitro* wandelt eine Erhöhung der cGMP-Konzentration den repulsiven Effekt von Sema3A in einen attraktiven Effekt um (Song et al., 1998). Semaphorine spielen aber nicht nur während der axonalen Wegfindung eine wichtige Rolle, sondern auch in der Migration von Neuralleistenzellen (Eickholt et al., 1999; Feiner et al., 2001) und von Interneuronen des Striatums oder des Cortex (Marin et al., 2001).

Neben den Klasse 3 Semaphorinen werden auch die meisten anderen Semaphorine im Gehirn exprimiert. Ihre Funktion ist jedoch *in vivo* bisher im ZNS noch nicht analysiert worden. Es ist jedoch vorstellbar, daß sie ebenfalls als repulsive Signalmoleküle wirken könnten. Allein für Sema4D konnte ein Effekt im Kollaps Assay *in vitro* nachgewiesen werden (Swiercz et al., 2002)

1.3.3 Semaphorin-Rezeptoren

Die repulsive Wirkung der Klasse 3 Semaphorine wird durch einen Rezeptorkomplex vermittelt, der Neuropilin-1 (Nrp-1) als Liganden-bindende Untereinheit und Mitglieder der A-Typ Plexine als Signal-transduzierende Untereinheit enthält (Rohm et al., 2000; He and Tessier Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997; Takahashi et al., 1999; Abb. 3). Dementsprechend zeigen explantierte sensorische Neuronen von *Nrp-1* Mutanten keine Reaktion auf Sema3A (Kitsukawa et al., 1997). Nrp-1 und Nrp-2 weisen weitgehend komplementäre Expressionsmuster in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben auf. Die Bindungsspezifitäten von Nrp-1 und -2 für verschiedene Klasse 3 Semaphorine können jedoch die Spezifität der Semaphorin-Rezeptoren nur teilweise erklären. Neben ihrer Funktion als Semaphorin-Rezeptoren können Nrp auch eine heterophile Zelladhäsion vermitteln (Takagi et al., 1995; Shimizu et al., 2000). In Vertebraten konnten bisher neun unterschiedliche Plexine identifiziert werden, die in vier Klassen, A-D, eingeteilt werden (Tamagnone et al., 1999; Maestrini et al., 1996; Fujisawa, et al., 1997). Die Ektodomäne aller Plexine enthält eine Sema-Domäne, eine Met- ähnliche Sequenz und Glyzin-Prolin-reiche Motive.

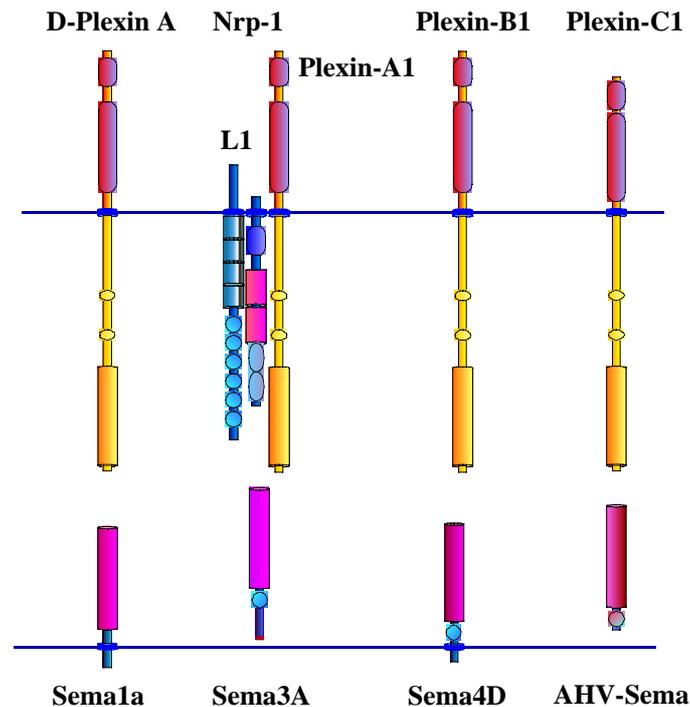


Abb. 3: Die Rezeptoren der Semaphorine. Die bisher identifizierten Semaphorin-Rezeptoren sind schematisch dargestellt. Das *Drosophila melanogaster* Semaphorin Sema1a bindet direkt Drosophila-Plexin A. Das sekretierte Sema3A bindet Neuropilin-1 (Nrp-1) als Liganden-bindende Untereinheit. A-Typ Plexin wirkt als Signaltransduzierende Untereinheit des Sema3A-Rezeptors. Ein weiterer Bestandteil des Sema3A-Rezeptors ist das Zell-Adhäsionsmolekül L1. Im Gegensatz zu den sekretierten Klasse 3 Semaphorinen bindet Sema4D direkt an Plexin-B1. Für das virale AHV-Sema (A39R) konnte eine Bindung an Plexin-C1, VESPR (*virus-encoded semaphorin protein receptor*) genannt, nachgewiesen werden (Fiore und Püschel, 2003)

Die zytoplasmatische Domäne ist hochkonserviert und zeigt Homologie zu Ras GAPs. Die verschiedenen Typen von Plexinen fungieren als Rezeptoren für unterschiedliche Semaphorin-Klassen. Das *D. melanogaster* D-Plexin A dient als Rezeptor für Sema1a (Winberg et al., 1998), während Plexin-B1 als Rezeptor für Sema4D fungieren kann (Tamagone et al., 1999). Plexin-C1 (VESPR) konnte als Rezeptor für Semaphorin 7A identifiziert werden (Sema7A) (Comeau et al., 1998). Im Unterschied zu Sema1a und Sema4D kann Sema3A aber nicht direkt an die Plexine binden. A-Typ Plexine und Neuropiline bilden unabhängig von einer Ligandenbindung einen stabilen Komplex (Tamagnone et al., 1999; Takahasi et al., 1999; Rohm et al., 2000). Analysen von *Plexina3^{-/-}* Mäusen bestätigten, daß Plexin-A3 als Rezeptoruntereinheit an der Vermittlung der Effekte von Sema3A und Sema3F beteiligt ist (Cheng et al., 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Plexin als Signal-transduzierende Rezeptorkomponenten der sekretierten und membranständigen Semaphorine dienen (Abb. 3). Die Rezeptoren der Klasse 3 Semaphorine benötigen neben Nrp-1 als Liganden-bindende Untereinheit wahrscheinlich noch weitere Komponenten, z.B. das Zelladhäsionsmolekül L1, für die Ausbildung eines funktionsfähigen Rezeptorkomplexes (Castellani et al., 2000).

1.3.4 Signaltransduktions-Kaskaden der Semaphorin-Rezeptoren

Das Verhalten des Wachstumskegels wird durch Dynamik des Zytoskeletts bestimmt. Inkubation sensorischer Axone mit Sema3A führt zu einer Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts und dem Kollaps des Wachstumskegels (Fan et al., 1993; Fournier et al., 2000). Bisher konnten nur wenige Proteine identifiziert werden, die Semaphorin-Rezeptoren mit dem Zytoskelett verbinden. Mehrere Interaktionspartner wurden für Plexine identifiziert. Ein Interaktionspartner von Plexinen ist die Oxidoreduktase MICAL. Sie ist vermutlich für die Vermittlung der repulsiven Wirkung notwendig und ist in *D. melanogaster* für die Funktion von D-Plexin A essentiell (Terman, et al., 2002). Der Mechanismus, der dem zu Grunde liegt, ist jedoch unbekannt. Desweiteren interagieren A-Typ Plexine mit der Tyrosinkinase Fes und werden von dieser phosphoryliert. Phosphorylierung durch Fes könnte ein wesentlicher Schritt in der Aktivierung der A-Plexine sein (Mitsui et al., 2002). Es ist jedoch noch unklar, wie diese Proteine bei dem durch Sema3A vermittelten Signalweg auf das Zytoskelett wirken.

Die Rho-Familie kleiner GTPasen spielt eine zentrale Rolle in der Organisation des Zytoskeletts (Hall, 1998). GTPasen fungieren als molekulare Schalter, deren Aktivität von zwei entgegengesetzten Mechanismen reguliert wird, den GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs). Dabei aktivieren GEFs GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP katalysieren, während GAPs deren intrinsische GTPase Aktivität stimulieren und durch den Austausch von GTP zu GDP das G-Protein inaktivieren. Zwei wichtige Mitglieder der GTPasen sind Rac1 und RhoA, deren Aktivität Zellmorphologie und -verhalten reguliert (Hall, 1998). Der durch Sema3A-induzierte Kollaps kann durch dominant-negatives Rac blockiert werden (Jin und Strittmatter, 1997; Fournier et al., 2000). Aktives Rac1 interagiert direkt mit der zytoplasmatischen Domäne von Plexin-B1, nicht aber mit der von Plexin-A1 (Vikis et al., 2000; Rohm et al., 2000; Driessens et al., 2001). Plexin-A1 bindet dagegen RhoD und Rnd1, zwei weitere Rho-ähnliche GTPasen. Diese üben einen antagonistischen Effekt auf die Aktivität von Plexin-A1 aus. Die Interaktion mit Rnd1 aktiviert Plexin-A1, während RhoD Plexin-A1 inhibiert (Zanata et al., 2002; Rohm et al., 2001).

Es wurde eine Vielzahl an Effektoren identifiziert, die die Funktion von Rho-GTPasen vermitteln. RhoA und Rac1 aktivieren ROCK (*Rho associated coiled coil kinase*) bzw. PAK (*p21-associated protein*). ROCK wiederum aktiviert die Serin-Threonin Kinase LIM-Kinase I, die Cofilin phosphoryliert und inhibiert. Cofilin induziert Aktin-Depolymerisation und ist für den Sema3A-induzierten Kollaps notwendig (Bamburg, 1999; Aizawa et al., 2001). Ein weiteres an der Wirkung von Sema3A beteiligtes Protein ist CRMP2 (Goshima et al., 1995), das ebenfalls ein Substrat von ROCK ist.

Über die Signalwege, die von membranständigen Semaphorinen aktiviert werden, ist weniger bekannt. Der Sema4D-Rezeptor Plexin-B1 bindet verschiedene RhoGEFs, wie PDZ-

RhoGEF und LARG, die nach Ligandenbindung RhoA aktivieren (Swiercz et al., 2002).

1.4 Das olfaktorische System

1.4.1 Die funktionelle Architektur des olfaktorischen Systems

Die Wahrnehmung von Gerüchen informiert den Organismus über die chemische Komposition seiner Umwelt (Firestein, 2001). Das olfaktorische Epithel (OE) enthält mehrere Millionen olfaktorische sensorische Neuronen (OSNs), die von Stammzellen ständig erneuert werden. OSNs sind bipolare Neurone mit einzelnen kurzen Dendriten, welche in der Nasenschleimhaut enden, und einem unverzweigten Axon, das vom OE in den *Bulbus olfactorius* (BO) projiziert. Im BO terminiert das Axon eines OSNs auf den Dendriten der Mitralzellen, wodurch ein Glomerulus von ungefähr 100 μm Durchmesser entsteht, der auch synaptische Kontakte mit Interneuronen enthält. Der BO der Maus enthält ungefähr 1800 Glomeruli. Gerüche werden durch die Stimulation von Geruchsrezeptoren (OR) wahrgenommen. Ein bestimmtes OSN in der Maus exprimiert nur eines der etwa 1000 OR Gene und von diesen jeweils nur ein Allel, so daß es im olfaktorischen System zu einer mosaiken Expression von mütterlichen und väterlichen vererbten Allelen kommt (Chess et al., 2000; Malnic et al., 1999; Strotmann et al., 2000; Ishii et al., 2001). Die Geruchsrezeptoren wurden 1991 von Buck und Axel identifiziert. Sie kodieren für G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen und repräsentieren die größte Genfamilie in Säugern (Mombaerts, 1999a; Mombaerts, 1999b; Glusman et al., 2001). Interessanterweise besitzen OR Gene keine Introns und sind ähnlich wie der T-Zellrezeptor Locus und die β -Globin-Genfamilie in Klustern angeordnet (Mombaerts, 2001; Tsuboi et al., 1999; Bulger et al., 1999). Das OE ist in vier Zonen unterteilt, die sich durch die Expression spezifischer ORs unterscheiden (Abb. 4; Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993). Die in Zonen aufgeteilte Organisation des Epithels ergibt sich nicht aufgrund physiologischer oder anatomischer Merkmale, sondern ist allein durch die Expressionsmuster der ORs festgelegt. Die Projektion

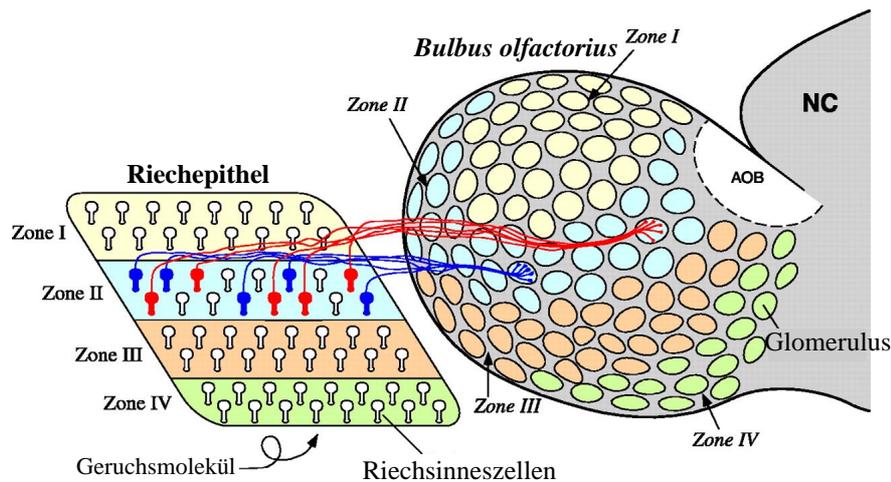


Abb. 4: Das olfaktorische System der Vertebraten. Vereinfachte Darstellung der funktionellen Architektur der Projektion olfaktorischer Axone im *Bulbus olfactorius* (BO) von Vertebraten. Ein Geruchsstoff bindet spezifisch einen Rezeptor im Riechepithel. Das Riechepithel ist in vier Zonen unterteilt, die durch die Expression spezifischer olfaktorischer Rezeptoren (ORs) charakterisiert sind. Riechsinneszellen, die den gleichen OR exprimieren, (OSN), konvergieren auf einen oder wenige Glomeruli im BO. OSN: Olfaktorische Riechsinneszellen; AOB: *accessory Bulbus olfactorius*; NC: Neocortex. (modifiziert nach Mori et al., 1999).

einzelner OSNs, die einen spezifischen OR exprimieren, kann in Mäusen mittels eines transgenen IRES-tauLacZ Markers verfolgt werden, der durch eine ‘Knock-in’ Strategie das Fusionsprotein tauLacZ mit Hilfe einer *internal ribosomal entry site* (IRES) zusammen mit dem jeweiligen OR von dem endogenen Promoter des ORs exprimiert. Dabei konnte festgestellt werden, daß Axone, die positiv für den OR P2 waren ($P2^+$), auf einen oder wenige Glomeruli konvergierten, während andere ORs Glomeruli innervierten, die eine weitere jeweils für den OR spezifische Position einnahmen (Mombaerts et al., 1996; Strotmann et al., 2000). Die Position der Glomeruli ist sowohl im Vergleich des BOs eines Individuums als auch im Vergleich verschiedener Individuen weitgehend invariant (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994). OSNs projizieren auf Glomeruli derart, daß in einem BO zwei spiegelbildlich symmetrische Repräsentationskarten entstehen (Belluscio und Katz, 2001). Ein Geruchsstoff aktiviert mehrere unterschiedliche ORs. Entsprechend werden im BO geruchsstoffspezifisch, räumlich umschriebene Areale neuronaler Aktivität für definierte Geruchsreize gefunden (Lancet et al., 1992; Guthrie et al., 1993; Johnson und Leon, 2000). Die Kombination aktivierter Geruchsrezeptoren wird in eine Kombination aktivierter Glomeruli übersetzt.

Ob diese räumlich strukturierte glomeruläre Repräsentationskarte des BOs auch in höheren Ebenen der Informationsverarbeitung erhalten bleibt, ist jedoch wenig erforscht. Erste Hinweise sprechen jedoch dafür, daß es zu einer Reduktion des Repräsentationsumfangs und eine, im Vergleich zu den scharf voneinander getrennten Glomeruli, diffuseren Organisation ihrer Projektionsfelder kommt (Zou et al., 2001).

1.4.2 Axonale Zielfindung im olfaktorischen System

Die spezifische Projektion von OSNs auf einen Zielglomerulus wirft die Frage nach dem Mechanismus der axonalen Zielfindung auf. Untersuchungen an transgenen Mäusen haben gezeigt, daß der Geruchsrezeptor selbst an der Zielfindung beteiligt ist und die Position des Zielglomerulus innerhalb des BOs bestimmt (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1997). Deletion des *P2* Rezeptorgens der Maus führt dazu, daß $P2^+$ Axone nicht mehr auf ihren Zielglomerulus konvergieren, sondern in der äußeren Nervenschicht des BOs verbleiben, ohne zu faszikulieren, in die glomeruläre Schicht einzutreten oder präsynaptische Strukturen auszubilden (Mombaerts et al., 1996). Der Austausch eines OR-Gens durch ein anderes mittels homologer Rekombination beeinflusst die Zielfindung der betroffenen Zellen ebenfalls (Wang et al., 1997). Zellen, die den *P3*-Geruchsrezeptor unter der Kontrolle des *P2*-Rezeptorgenlocus exprimieren, bilden einen ektopischen Glomerulus, der an den *P3*-Glomerulus angrenzt, jedoch weit vom ursprünglichen *P2*-Glomerulus entfernt liegt. Die Identität des exprimierten Rezeptors ist demnach maßgebend für die Position des Zielglomerulus innerhalb des BO. Die Bedeutung der ORs für die axonale Zielfindung läßt rezeptorvermittelte neuronale Aktivität in den OSN als eine mögliche Grundlage dieses Phänomens vermuten. In mehreren Studien wurden daher der Einfluß neuronaler Aktivität während der Etablierung des glomerulären Musters untersucht (Zheng et al., 2000; Lin et al., 2000; Zhao und Reed, 2001). Jedoch zeigen Mausmutanten, in denen eine Untereinheit des CNG-Kanals (*cyclic nucleotid-gated channel*), einer der wichtigsten Kanäle in der Signaltransduktion des Riechsystems, deletiert ist, eine normale Struktur und Topographie des glomerulären Musters. In einer weiteren Studie wurde von der Lokalisation der Untereinheit des CNG-Kanals auf dem X-Chromosom Gebrauch gemacht. Aufgrund der Inaktivierung des X-Chromosoms entwickelte sich in Weibchen, die für die Mutation heterozygot waren, ein Mosaik inaktiver und aktiver Sinneszellen. So konnte gezeigt werden, daß inaktive Zellen von aktiven verdrängt werden (Zhou und Reed, 2001). Demnach ist wie bei der retinalen Projektion im Thalamus neuronale Aktivität für das Überleben der OSNs und die Stabilität ihrer synaptischen Verbindungen von entscheidender Bedeutung. Dabei ist die Aktivität aber nicht *per se* von Bedeutung, sondern die relativen Unterschiede in der Aktivität.

Neben den ORs spielen aber auch Signalmoleküle der axonalen Wegfindung eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des BO. Dabei gibt es erste Hinweise, daß sie auch für die Etablierung der topographischen Repräsentationskarte verantwortlich sind, und die lateromediale oder anterior/posteriore Orientierung der Axone beeinflussen (Taniguchi et al., 2003). Der Sema3A Rezeptor *Nrp-1* wird im BO auf den Axonen der OSNs exprimiert. $Nrp-1^+$ Axone sind im rostralen BO in der lateralen Nervenschicht nachweisbar, während sie im caudalen BO in der mediale Region zu finden sind. Sema3A wird komplementär zu $Nrp-1^+$ Axone exprimiert und ist in der ventralen Nervenschicht nachweisbar. Wie durch Analysen

des olfaktorischen Systems in *Sema3a* Mutanten gezeigt wurde, hat Sema3A daher eine repulsive Wirkung auf OSN Axone *in vivo* (Schwartz et al., 2000). In *Sema3a* Mutanten sind Nrp-1⁺ Axone nicht auf die laterale bzw. mediale Region des BO beschränkt, sondern verteilen sich zusätzlich über die gesamte ventrale Nervenschicht, was mit einer Ausbildung ektoptischer Nrp-1⁺ Glomeruli einhergeht. Es ist unwahrscheinlich, daß Sema3A allein für die Etablierung der lateralen und medialen Achse des BO verantwortlich ist, allerdings sind die beschriebenen Phänotypen ein Hinweis darauf, daß Sema3A im olfaktorischen System als chemotropes Signal wirkt. Jedoch ist unklar, ob die Fehlprojektion von Nrp-1⁺ Axonen zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung korrigiert wird. So konnten die Effekte, die durch die Inaktivierung des CNG-Kanals entstanden, erst in adulten Stadien beobachtet werden.

1.5 Die Funktion von Nrp-1 im vaskulären System

1.5.1 Die Entwicklung des Blutgefäßsystems

Nrp-1 ist nicht nur ein Bestandteil des Sema3A Rezeptors, sondern auch an der Funktion von VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) beteiligt. In den letzten Jahren zeigte sich, daß die Entwicklung des Nerven- und des vaskulären Systems eng miteinander verbunden ist. Beide Systeme sind stark hierarchisch organisiert und beeinflussen teilweise gegenseitig ihre Morphogenese (Shima und Mailhos, 1998). Die Ausbildung des Blutgefäßsystems kann in zwei Phasen eingeteilt werden. In einer frühen Phase der Entwicklung wird durch einen Prozess, der als Vaskulogenese bezeichnet wird, zunächst ein Netzwerk von Kapillaren ausgebildet, indem Endothelzellen differenzieren und tubuläre Strukturen ausbilden (Risau, 1997; Yancopoulos et al., 2000; Abb. 5 A, linke Spalte). Diese Kapillaren bilden ein wabenähnliches Muster, das als primärer Plexus bezeichnet wird. Anschließend wird in der folgenden Phase der Angiogenese durch Umstrukturierung des ursprünglichen Netzwerks eine hierarchisch-organisierte Struktur gebildet, so daß die typische, verzweigte Anordnung des Blutgefäßsystems entsteht (Abb. 5 A). Gleichzeitig reifen die Blutgefäße, indem Endothelzellen glatte Muskelzellen und Perizyten rekrutieren und eine extrazelluläre Matrix bilden. Avaskuläre Gewebe wie z.B. das Nervensystem werden durch Sprossung von bestehenden Blutgefäßen vaskularisiert

1.5.2 Regulation der Entwicklung des vaskulären Systems

Drei Proteinfamilien spielen eine wichtige Rolle während der Blutgefäßentwicklung: die Angiopoietine, die VEGF-Proteinfamilie und die Ephrine. Auf die letzten beiden erwähnten Proteinfamilien soll im folgenden näher eingegangen werden.

Die VEGF-Proteinfamilie besteht aus 5 Mitgliedern (VEGF-A bis D, sowie PlGF), die drei miteinander verwandte Rezeptortyrosinkinasen mit einer hohen Affinität binden (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 und VEGFR-3/Flt-4) (Carmeliet und Collen, 1999; Dvorak et al.; 1999; Ferrara et al., 2000; Neufeld et al.; 1999). Von VEGF-A sind 3 Isoformen bekannt (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₈), die sich in ihrer physiologischen Funktion unterscheiden (Rossant and Howard, 2002). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Rezeptoren wurde auch Nrp-1 als Rezeptor für VEGF₁₆₅ identifiziert (Yancopoulos et al., 2000). Nrp-1 kann als Korezeptor für VEGF₁₆₅ die Affinität von VEGFR-2 erhöhen. VEGF-A induziert durch Aktivierung von VEGFR-2 sowohl die Proliferation und Migration von Endothelzellen als auch das Auswachsen und die Umstrukturierung existierender Blutgefäße (Gale und Yancopoulos, 1999). Damit ist VEGF von essentieller Bedeutung für Angiogenese

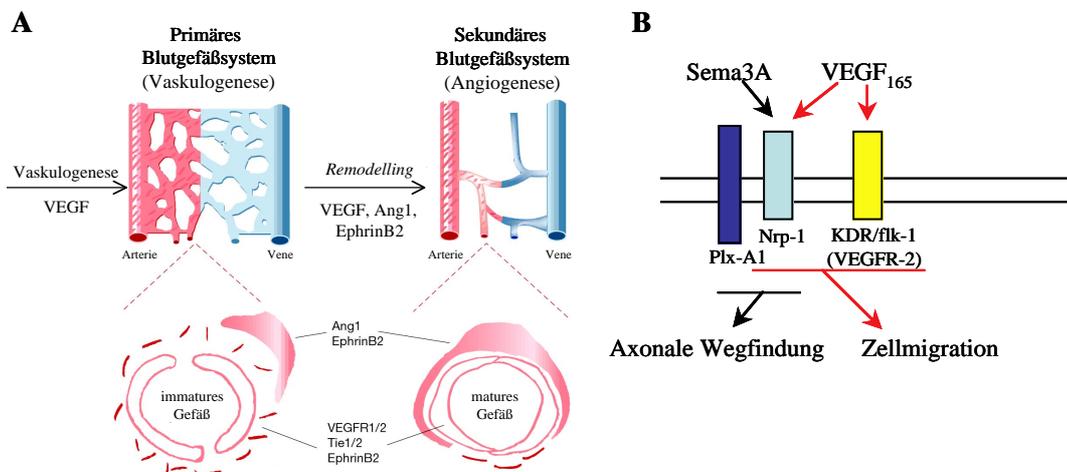


Abb. 5: Schematische Darstellung der Entwicklung des Blutgefäßsystems. (A) Der Entwicklungsprozess, der zur Ausbildung des maturaen Blutgefäßsystems führt, ist dargestellt. Während der Vaskulogenese expandieren und differenzieren Angioblasten, um unter der Kontrolle von VEGF das primäre Blutgefäßsystem zu bilden. Dieses wird anschließend durch Angiogenese umgestaltet. Dieser Prozess wird durch die Faktoren VEGF, Angiopoetin und den Ephrinen reguliert und führt zu der Etablierung differenzierter Blutgefäße. (B) VEGF₁₆₅ wirkt primär über den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2). Nrp-1 wirkt dabei als Korezeptor für VEGFs, bindet außerdem aber auch mit hoher Affinität Sema3A und vermittelt zusammen mit Plexin-A1 (Plx-A1) dessen Funktion bei der axonalen Wegfindung. VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; Plx-1: Plexin A-1; Nrp-1: Neuropilin-1; KDR/flk-1: Rezeptor für VEGF₁₆₅ (VEGF-Rezeptor); Ang-1: Angiopoetin-1. (modifiziert nach Yancopoulos et al., 1999).

und Vaskulogenese. Entsprechend sterben *Vegfa* und *Vegfr-2* Mausmutanten an E8,5 aufgrund einer starken Reduktion der Bildung von Endothelzellen und einem nahezu vollständigen Fehlen einer Vaskulatur (Shalaby et al., 1995).

Die Differenzierung der Blutgefäße in Arterien und Venen wird von den Ephrinen moduliert. Ephrine sind eine Familie von Proteinen, die entweder mittels eines GPI-Ankers (Typ A) oder einer Transmembrandomäne (Typ B) in der Membran verankert sind. Als ihre Rezeptoren dienen die Eph Rezeptortyrosinkinasen (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998). *Ephrin-B2* mRNA (*Efnb2*) ist selektiv in Endothelzellen von Arterien zu finden, während der Rezeptor EphB4 in Venen nachweisbar ist (Wang et al., 1998). Analyse von *EfnB2* und *EphB4* defizienten Mäusen zeigte, daß ihre Interaktion essentiell für die Segregation von Venen und Arterien ist (Wang et al., 1998; Gerety et al., 1999). Der Phänotyp von *Ephb4* Mutanten ähnelt dem der *Angpt* und *Tie-2* 'Knock-out' Mäusen, was darauf hin deutet, daß die beiden Signalwege während der Angiogenese interagieren (Gale and Yancopoulos, 1999). Die Ephrine sind die erste Proteinfamilie, für die sowohl eine Funktion bei Blutgefäßentwicklung und axonaler Wegfindung nachgewiesen wurde.

1.5.3 Die Funktion der Semaphorine im vaskulären System

Genetische Analysen der Semaphorine und ihrer Rezeptoren zeigten, daß diese Proteine auch wesentliche Funktionen außerhalb des Nervensystems übernehmen. *Sema3a* defiziente Mäusen leiden an einer Hypertrophie der rechten Herzkammer (Behar et al., 1996). In *Sema3c* Mutanten konnten starke kardiovaskuläre Defekte festgestellt werden, die auf einer fehlerhaften Separierung des cardialen Bereiches des Blutaustritts zurückzuführen sind (Feiner et al., 2001). Dieser Phänotyp kann auf Defekte in der Migration von kardialen Neuralleistenzellen beruhen (Brown et al., 2001).

Auch Nrp-1 übt eine Funktion im vaskulären System aus. So bindet VEGF-A₁₆₅ neben VEGFR-1 und -2 auch Nrp-1 (Abb. 5 B). Die Bindungsstellen von VEGF₁₆₅ und Sema3A liegen in der b1/2-Domäne von Nrp-1 und sind überlappend, so daß VEGF₁₆₅ und Sema3A um diese Bindungsstelle kompetetieren. So kann die repulsive Wirkung von Sema3A auf sensorische Axone durch VEGF unterdrückt werden. Desweiteren reguliert das Gleichgewicht von Sema3A und VEGF₁₆₅ Aktivität die Migration und Apoptose von neuronalen Vorläuferzellen (Bagnard et al., 2001). Die Überexpression von Nrp-1 in transgenen Mäusen führt zur Überproduktion von Blutgefäßen im Nervensystem (Kitsukawa et al., 1997). *Nrp-1* defiziente Mäuse hingegen zeigen eine verminderte Anzahl an Blutgefäßen im ZNS und starke Defekte während der Angiogenese bei der Umstrukturierung des primären Plexus (Kawasaki et al., 1999). *Nrp-2* Mutanten weisen jedoch keine vaskulären Defekte auf (Chen et al., 2000; Giger

et al., 2000). *Nrp-1^{-/-}/Nrp-2^{-/-}* Doppelmutanten lassen ähnlich wie *Vegf-a* und *Vegfr-2* defiziente Mäuse vaskuläre Defekte im Dottersack und avaskuläre Regionen im Kopf und Rumpf erkennen (Takashima et al., 2002). Diese Daten implizieren, daß Neuropiline eine wichtige Funktion während der Angiogenese und Vaskulogenese übernehmen. Es ist jedoch bisher unklar, ob die vaskulären Defekte durch eine Störung der Funktion von VEGF oder der von Semaphorinen verursacht werden, und ob Nrp-1 als Rezeptor die von Semaphorinen und VEGF übermittelten Signale integriert, oder ob diese unabhängig voneinander über Nrp-1 wirken.

1.6 Ansätze zur Analyse von Semaphorinen der Klasse 4

Die Funktion der Klasse 4 Semaphorine ist weitgehend unbekannt. Ihre Expression ist im Nervensystem in zahlreichen Strukturen nachweisbar, jedoch auch in nicht-neuronalen Geweben können Transkripte der Klasse 4 Semaphorine nachgewiesen werden. Nur Sema4D ist teilweise funktionell charakterisiert worden. So kann Sema4D hippocampale Wachstumskegel kollabieren lassen und spielt eine Rolle während der T-Zellaktivierung. Desweiteren konnten für Sema4A und Sema4D extrazelluläre Bindungspartner nachgewiesen werden (Kumanogoh et al., 2002, die Aufschluß über die Funktion im Immunsystem geben könnten). Die Analyse der Aminosäure-Sequenzen der Klasse 4 Semaphorine zeigt, daß, alle bis auf Sema4A und Sema4D ein C-terminales PDZ-Bindemotiv enthalten (Abb. 15A). Diese Beobachtung könnte einen Einstieg in die funktionelle Analyse ermöglichen.

PDZ-Domänen üben in zahlreichen Molekülen sehr unterschiedliche Funktionen aus. So organisieren sie makromolekulare Komplexe z.B. in synaptischen Verbindungen und *Tight Junctions* und verankern diese oft in der Membran durch Interaktion mit integralen Membranproteinen.

1.6.1 PDZ-Domänen Proteine in postsynaptischen Spezialisierungen

Die postsynaptische Membran zentralnervöser exzitatorischer Synapsen ist durch eine elektronendichte Struktur, die als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird, gekennzeichnet. Die PSD dient der Konzentration und Organisation von Rezeptoren und Ionenkanälen und enthält einen Großteil der postsynaptischen Signalkaskade. Ein wichtiger struktureller Bestandteil der PSD sind Proteine wie PSD-95, die eine **PDZ** Domäne (**PSD-95/SAP-90**, **Disc-large**, **ZO-1**) aufweisen (Kennedy, 1998; Hsueh und Sheng, 1998; Garner et al., 2000;

Husi et al., 2000; Hoskins et al., 1998). Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Synaptogenese, der Bildung von Rezeptorklustern und Signaltransduktionsprozessen. PSD-95 ist eine membranassoziierte Guanylatkinase (MAGUK). Neben mehreren PDZ-Domänen enthält es zusätzlich zwei weitere Protein-Protein Interaktionsdomänen: eine Src-Homologie-3 (SH3) und eine Guanylatkinase- (GK) Domäne (Tavares et al., 2001; Shin et al., 2000).

PDZ-Domänen binden mit hoher Affinität an kurze Peptidsequenzen, welche in der Regel am C-Terminus des interagierenden Proteins lokalisiert sind. Es lassen sich drei Klassen von PDZ-Bindemotiven unterscheiden (Abb. 15 B). Die Bindemotive der ersten Klasse, die z.B. bei PSD-95 Liganden zu finden sind, haben die Konsensussequenz -S/T-X-V, während die Klasse 2 durch Phenylalanin- oder Tyrosinreste an der -2 Position charakterisiert sind. Klasse 3 PDZ-Bindemotive sind durch eine Konsensussequenz mit einem geladenen Aminosäurerest gekennzeichnet (Sheng und Sala, 2001). Kristallographische Studien zeigen, daß die PDZ-Domäne aus zwei α -Helices und sechs antiparallelen β -Faltblättern besteht (Morais Cabral et al., 1996). PDZ-Domänen können aber auch interne Sequenzmotive in einem β -Finger, z.B. bei der Interaktion von nNOS mit PSD-95 binden (Brenman et al., 1996).

PDZ-Domänen Proteine spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der synaptischen Lokalisierung und Funktion von Glutamaterezeptoren, wie AMPA ($_{DL}$ - α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole Propionsäure) und NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat). Durch ihre Interaktion werden diese in der PSD konzentriert. Diese Rezeptorkluster entstehen durch die Verankerung von Rezeptoren in hoher Dichte in der Plasmamembran (Topinka und Bredt, 1998). PDZ-Domänen Proteine wie GRIP/ABP und PICK1 sind zudem an der Endozytose und Recycling ihrer Zielprotein beteiligt (Rongo et al., 1998). So interagiert die GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors mit SAP-97, während GluR2 die Multi-PDZ-Proteine GRIP/ABP und PICK1 bindet (Leonard et al., 1998; Dong et al., 1997; Srivastava et al., 1998; Xia et al., 1999). Dabei ist die Interaktion mit PICK1 für die Lokalisation des AMPA-Rezeptors an der PSD verantwortlich (Kim et al., 2001). PSD-95 bindet eine konservierte Sequenz im C-Terminus der NR2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Leonard et al., 1998; Kornau et al. 1995; Kim et al., 1997; Niethammer et al., 1996; Doyle et al., 1996). Überexpression von PSD-95 in nicht-neuronalen Zellen führt zur Bildung von Mikroaggregaten heterooligomerer NMDA-Rezeptoren (Kim et al., 1998; Hsueh et al., 1997). Über die SH3 und GK-Domäne kann PSD-95 autoaggregieren, was für eine Klusterbildung der NMDA-R wichtig ist (Shin et al., 2000). Allerdings führt die Deletion des Gens für die NR2-Untereinheit, die den Verlust der Bindung des NMDA-R an PSD-95 zur Folge hat, oder die Mutation von PSD-95 nur zu einer geringen Beeinträchtigung der NMDA-R-Aggregation (Sprengel et al., 1998; Mori et al., 1998; Migaud et al., 1998). PSD-95 spielt nicht nur eine Rolle für die Struktur sondern auch bei der Differenzierung und Bildung von synaptischen Spezialisierungen. So ist PSD-95 in hippocampalen Neuronen früher als die NMDA-R in Synapsen nachweisbar (Rao und Craig, 1998).

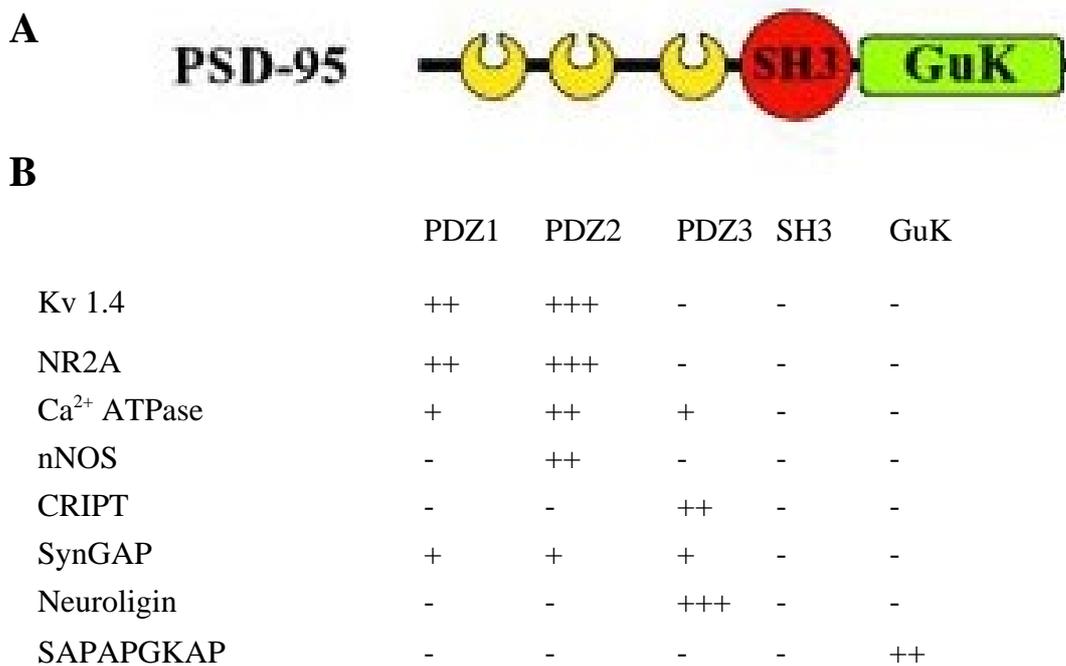


Abb. 6: (A) Schematische Darstellung der Struktur von PSD-95. PSD-95 gehört zu der Familie der PDZ-Domänen Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Organisation der postsynaptischen Dichte spielen. Es enthält drei PDZ-Domänen (gelb), eine SH3-Domäne (rot), und eine Guanylatkinase-Domäne (grün). (B) Tabellarische Aufführung der Interaktionspartner von PSD-95. PSD-95 interagiert mit verschiedenen Proteine über die 5 Protein-Interaktionsdomänen PDZ, SH3 und GK, und kann so die Proteine an der PSD verankern.

Überexpression von PSD-95 in hippocampalen Neuronen bewirkt eine schnellere Reifung exzitatorischer Synapsen (Husseini et al., 2000). Desweiteren organisiert PSD-95 auch die nachgeschalteten Signalkaskaden. PSD-95 rekrutiert die Calmodulin-abhängige Stickoxid-Synthetase nNOS, die nach Ca²⁺-Einstrom durch den NMDA-R aktiviert wird in die PSD. Sie ist für die aktivitätsabhängige Plastizität synaptischer Verbindungen wichtig (Sattler et al., 1999).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Um die Funktion von Semaphorinen zu beschreiben, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die physiologische Funktion des sezernierten Sema3A mit einem genetischen Ansatz untersucht. Zum anderen sollte eine biochemische Analyse neue Erkenntnisse über die Funktion der Klasse 4 Semaphorine ergeben.

Um die physiologische Rolle von Sema3A zu charakterisieren, wurden zwei Aspekte näher untersucht. Durch Analysen des olfaktorischen Systems konnte gezeigt werden, daß Sema3A Expression in der ventralen Nervenschicht des BO die Projektionen von Nrp-1⁺

Axonen auf die mediale und laterale Regionen des BO beschränkt. Demnach ist es von Interesse zu untersuchen, ob Sema3A als Gradient *in vivo* wirkt. Insbesondere sollte hier eine Subpopulation von Axonen, die einen spezifischen OR exprimieren, untersucht werden. Nrp-1 ist ein Rezeptor für Sema3A und VEGF. *Nrp-1* Mutanten zeigen starke Defekte in der Entwicklung des vaskulären Systems. Es ist wahrscheinlich, daß diese überwiegend aufgrund der Funktion als VEGF-Rezeptor entstehen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß Sema3A an diesen Prozessen ebenfalls beteiligt ist. Aus diesem Grund sollte die Funktion von Sema3A in der Entwicklung des vaskulären Systems näher charakterisiert werden.

Bisher ist die Funktion der membrangebundenen Semaphorine im Nervensystem unbekannt. Es ist unklar, ob diese Semaphorine als Liganden, als Rezeptoren oder als Komponenten von Rezeptorkomplexen fungieren können. Die Identifizierung und Analyse von Interaktionspartnern könnte einen Einblick in ihre Funktionen oder die daran beteiligten Signalkaskaden geben. Fünf Mitglieder der Klasse 4 Semaphorine zeigen ein C-terminales PDZ-Bindemotiv. Diese Beobachtung sollte als ein Ansatz für die funktionelle Analyse dieser Proteine genutzt werden. Dabei sollte geklärt werden, welche PDZ-Domänen Proteine mit Klasse 4 Semaphorinen interagieren, und welche mögliche Funktion diese Bindung hat. Desweiteren sollte in einem genetischen Ansatz ein Targeting-Vektor für das membrangebundene Sema4G generiert werden, um eine genetische Analyse der Klasse 4 Semaphorine zu beginnen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Bakterien-Inkubatoren	Memmert, Schwabach
Bakterien-Schüttler	Memmert, Schwabach
Bio Doc Analyse für Agarose Gele	Biometra, Göttingen
Biorad-Micropulser	Biorad, München
French Pressure Cell Press	Thermo Spectronic
Heizblock	Stuart Scientific, Omnilab, Münster
Horizontal-Elektrophoresekammer	Biorad, München
Horizontalschüttler	Eppendorf, Hamburg
Image Reader BAS-180	Fujifilm, Straubenstadt
Image Reader LAS-100	Fujifilm, Straubenstadt
Inkubatoren für die Zellkultur	Kendro, Hanau
Kryotom CM 3050	Leica, Braunschweig
Labofuge GL	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	Janke und Kunkel, Staufen
Mikrotom	Leica, Braunschweig
pH-Meter, digital	Knick, Ominlab, Münster
Thermocycler, Biometra UnoII	Biometra, Göttingen
Röntgenfilmentwicklungsgerät	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Sequenziergerät	ABI Prism, Darmstadt
	Megabace, Amersham
	Pharmacia, Freiburg
Sorvall-Zentrifuge (HB-4,SS34,GSA)	Sorvall Kendro, Düsseldorf
Speedvac Vakuumkonzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Sterile Werkbank	Kendro, Hanau
Tischzentrifuge 5412	Eppendorf, Hamburg
Transfer-Blotkammer	Roth, Karlsruhe
Überkopfschüttler	Heidolph, Keilheim
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidleberg
Vertikal-Elektrophorese-Kammer	Biorad, München

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Applichem, Diagonal, Fluka, Gibco-BRL-Invitrogen, Merck, Serva, Sigma, Roche Diagnostic GmbH und Roth. Wasser zur Herstellung von Lösungen wurde mit dem Milli-Q-Water System (Milipore) und dem Reverse Osmosis System (Sartorius) gereinigt.

2.1.3 Medien und Antibiotikallösungen für Bakterienkulturen

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

LB-Flüssigmedium (Luria-Bertani-)	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,5	
LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Bacto-Agar	15 g/l
	pH 7,5	
LB-Topagar	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Bacto-Agar	15 g/l
	10 % MgSO ₄	
	pH 7,5	
LB-Medium für λ-Phagen	LB-Medium	
	0,2% Maltose	
	10 mM MgSO ₄	
Antibiotika	50 µg/ml Ampicillin	
	50 µg/ml Kanamycin	

50 µg/ml Chloramphenicol

2.1.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Trypsin/ EDTA	2,5% Trypsin/EDTA (w/v)
Zürich-PBS	137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 3 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
PBS-EDTA	1 mM EDTA in Zürich-PBS
MEM +10% FCS	Minimum Essential Medium 2 mM Glutamin 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (v/v), Biochrom, Berlin
DMEM + 10% FCS	Dubellco's Modified Eagles Medium 2 mM Glutamin 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (v/v), Biochrom, Berlin
Neurobasalmedium	Neurobasalmedium 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 2 % B27
Papain-Lösung für Primärkultur	15 % Papain (Sigma) 10 mg/ ml DNase 10 mM Glucose in PBS
2X BBS	50 mM N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES)

280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄

Fugene 6-Transfektionsreagenz Roche Diagnostics, Mannheim

1-β-D-Arabinofuranosid-Cytosin 3 mM, Sigma, Kat. Nr.: C1768
(AraC) Steinhausen

Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma, Steinhausen

Poly-L-Ornithin Sigma, Steinhausen

2.1.5 Lösungen für molekularbiologische Methoden

Plasmid-Präparation (Alkalische Lyse)

Sol A Resuspensionspuffer 50 mM Glukose
25 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA, pH 8,0
10 mg/ml RNase

Sol B Lysispuffer 1 % SDS
0,2 M NaOH

Sol C Neutralisationspuffer 3 mM Kaliumacetat
2 M Eisessig

Plasmid-Maxi und QIAwell-Präparation (Qiagen)

P1 Resuspensionspuffer 50mM Tris/HCl
10 mM EDTA
100 µg RNase/ml

P2 Lysispuffer 200 mM NaOH
1 % SDS

P3 Neutralisationspuffer 2,55 M Kaliumacetat, pH 8,8

QBT	Equilibrierungspuffer	50 mM MOPS 1 M NaCl 15 % Ethanol 0,15 % Triton X-100 pH 7,0
-----	-----------------------	---

QC	Waschpuffer	50 mM MOPS 1 M NaCl 15 % Ethanol pH 7,0
----	-------------	--

QFElutionspuffer		10 mM Tris HCl, pH 8,5
------------------	--	------------------------

Isolierung von genomischer DNA aus Lambda-Phagen und BACs

SM-Puffer		50 mM Tris/HCl, pH 8 8mM MgSO ₄ 0,1 mM NaCl 0,01 % Gelantine (w/v)
-----------	--	--

L1		300 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 10 mM EDTA 0,2 mg/ml BSA 20 mg/ml RNase A 6 mg/ml DNase I
----	--	--

L2		30 % Polyethylenglykol (PEG 6000) 3 M NaCl
----	--	---

L3		100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 25 mM EDTA, pH 8
----	--	--

L4		4 % SDS
----	--	---------

L5		3 M Kaliumacetat, pH 5,5
----	--	--------------------------

TES		10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
-----	--	--

		0,1 M NaCl 250 µg Lysozym
DNase freie RNase		Roche Diagnostics, Mannheim
QBT, QC, QF		siehe Plasmidpräparation
Gelextraktion		
PCI		Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (v/v/v), 25:24:1
PB	Waschpuffer 1	50 mM MOPS 1 M NaCl 15 % Ethanol pH 7,0
PE	Waschpuffer 2	50 mM Tris/HCl 1,25 M NaCl 80 % Ethanol pH 8,5
EB	Elutionspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,5

Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien und Zellen

<i>Tail</i> -Puffer		50 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS 10 mg/ml Proteinase K
---------------------	--	---

DNA-Agaroseelektrophorese

10X TBE		1 M Tris/HCl 890 mM Borsäure 10 mM EDTA
---------	--	---

6X DNA-Laufpuffer
50 % Glycerin
15 mM EDTA
0,15 % Bromphenolblau
0,15 % Xylencyanol

1 kb-Ladder Eurogentec, Köln

Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml in Wasser

Nukleinsäuretransfer

20X SSC 3 M NaCl
0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat
pH 7,0

0,25 N HCl

Transferpuffer 0,4 M NaOH
0,6 M NaCl

Neutralisationspuffer 0,5 M Tris/HCl, pH 7,0
1 M NaCl

Hybridisierung von Nukleinsäuren

Hybridisierungslösung 1 M NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 % Dextran Sulfat
1 % SDS
0,5 mg Heringssperm-DNA/ml (sonifiziert)

Waschlösung 2X SSC, 0,1 % SDS
0,5X SSC, 0,1 % SDS
0,1X SSC, 0,1 % SDS

2.1.6 Material für molekularbiologische Methoden

QIAvac Manifold 6	QIAgen, Hilden
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase, RNase frei	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs (<i>PCR grade</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Advantage Taq 2-Polymerase	Clontechh, Heidleberg
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics, Mannheim MBI-Fermentas, St. Leon-Roth New England Biolabs,
Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Polynukleotidkinase (PNK)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Elektroporationsküvetten	Eurogentec, SA, Seraing, Belgien
Ready-to-go-Labeling-Kit	Amersham Pharmacia LKB, Freiburg
Probe Quant TM -50 Micro-Säulchen	Amersham Pharmacia LKB, Freiburg
Sequencing Kit mit Fluoreszenz markierten dNTPs oder	ABI Prism, Darmstadt
Labeling Kit für Megabace	Amersham Pharmacia, Freiburg
Hybond N+ Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.7 Lösungen für biochemische Methoden

2.1.7.1 Puffer für die Herstellung von Proteinlysaten

CMFH-Puffer (10X)	5,4 mM KCl 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 4,2 mM NaHCO ₃ 137 mM NaCl 5,6 mM Glucose <i>Proteinase Inhibitor Cocktail</i> (Roche)
-------------------	---

	pH 7,4
Lysispuffer 1	1 % Triton X-100 0,1 % SDS (w/v) 0,5 % Na-Desoxycholat <i>Proteinase Inhibitor Cocktail</i> (Roche) 1X PBS

2.1.7.2 Puffer für den *GST-Pulldown*-Assay

TLB-Puffer	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 <i>Complete Proteinase Inhibitor Cocktail</i> (Roche)
------------	--

PD-Waschpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM DTT 1,5 mM MgCl ₂ 4 mM EDTA 10 % Glycerol 0,1 % Triton X-100 <i>Complete Proteinase Inhibitor Cocktail</i> (Roche)
----------------	--

2.1.7.3 Puffer zur Kultivierung, Expression und Lysis rekombinanter Proteine

Lysis-Puffer 2	2 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 10% Glycerol <i>Proteinase Inhibitor Cocktail</i> (Roche) 1X PBS
Ni-NTA-Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄

0,01 M Tris/HCl
pH 8,0

2.1.7.4 Puffer zur Aufreinigung rekombinanter Proteine

Ni-NTA-Puffer C
8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
pH 6,3

Ni-NTA-Puffer D
8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
pH 5,9

Ni-NTA-Puffer E
8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
pH 4,5

2.1.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel
7,5 % oder 10 % (v/v) 40 % Acrylamid
0,375 M Tris/HCl
0,1 % SDS (w/v)
4 µl/ml 10% Ammoniumpersulfat
0,72 µl/ml TEMED

Sammelgel
4 % (v/v) 40 % Acrylamid
0,1 % SDS (w/v)
6 µl/ml 10 % Ammoniumpersulfat
0,72 µl/ml TEMED

5X Probenpuffer
15 % SDS (w/v)
50 % Glycerol (v/v)
15 % β-Mercaptoethanol (w/v)
1,5 % Bromphenolblau (w/v)

High Molecular Weight Marker	Sigma Aldrich, Steinhausen Kat. Nr. M3788
Low Molecular Weight Marker	Sigma Aldrich, Steinhausen Kat. Nr.: L3788
10X PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glyzin 0,1 % SDS (w/v)
Coomassie-Blau	0,25 % Coomassie-Blau R250 (w/v) 10 % Essigsäure (v/v) 50 % Methanol (v/v)
Entfärbelösung	10 % Essigsäure (v/v) 50 % Methanol (v/v)

2.1.7.6 Western Transfer

Transferpuffer	25 mM Tris 250 mM Glyzin 0,1 % SDS (w/v) 20 % Methanol (v/v)
Ponceau-Lösung	0,5 % Ponceau S 1 % Trichloressigsäure

2.1.7.7 Nachweis von Proteinen

Blocklösung 1	3 % BSA 1X PBS
Blocklösung 2	10 % Magermilchpulver 0,3 % Tween-20 1X PBS
ECL-System	Super Signal, Pierce Best. Nr.: 34080

<i>Stripping</i> -Puffer für Nitrocellulose	0,2 M Glyzin 0,5 M NaCl pH 2,8
---	--------------------------------------

2.1.8 Material für biochemische Methoden

Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll,
PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg
Glutathione-Sepahorse TM	Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg
Protein-G-Sepharose	Roche Diagnostics, Mannheim
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Quick Lowry Kit	Biorad, München

2.1.9 Material und Lösungen für Immunhistochemie

Fixierungspuffer 1	4 % Paraformaldehyd/ 1X PBS
Fixierungspuffer 2	4 % Paraformaldehyd 15 % Saccharose 1X PBS
Fixierungspuffer 3	3,7 % Formaldehyd 0,2 % Glutaraldehyd 1 X PBS
Gefrierschutz	30 % Saccharose/ 1X PBS
PLP-Fixierungspuffer	2% Paraformaldehyd 75 mM L-Lysine 10 mM Natrium-periodate M NaH ₂ PO ₄ pH 7.2
Permeabilisierungspuffer 1	0,1 % Triton X-100/ 1X PBS

Permeabilisierungspuffer 2	0,1 % Triton X-100 0,1 % Na-Citrat PBS
Blockreagenz 1	10 % Fötale Kälberserum/ 1X PBS
Sigma Fast DAB Tabletten	10 mg, Sigma, Steinhausen
PBS-MT (für <i>Whole mount</i> -Färbungen)	3 % Magermilchpulver 0,1 % Triton X-100 1X PBS
PBT (für <i>Whole mount</i> -Färbungen)	0,2 % BSA 0,1 Triton X-100 1X PBS
Färbelösung 1	0,3 mg/ml DAB 0,5 % NiCl ₂ 1 X PBS-MT
Färbelösung 2	0,3 mg/ml DAB 0,5 % NiCl ₂ 0,03 % H ₂ O ₂ 1 X PBS-MT
Blockreagenz 2 (für Schnitte)	3 % BSA 0,1 % Tween-20 1X PBS
X-Gal-Färbelösung	2 mM MgCl ₂ 0,02 % Nonidet P40 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] X 3 H ₂ O
Thermanox-Coverslips	Nunc
Immunofluoreszenz-Einbettmedium	Dako, Hamburg

2.1.10 Bakterienstämme

XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F'proABlacIqZM15, TN10 (<i>tet^R</i>)], Stratagene, Heidelberg
DH5 α	<i>FΔlacU169(σ80lacZ), ΔM15, hsdR17, recA1, endA1, supE44, gyrA96, thi-1, relA1</i> (Hanahan, 1983)
M15	Plasmid tragend: pREP4 (Km ^r) <i>nal^Sstr^Srif^Slac^rara^rgal^rmtl^rrecA⁺uvr⁺</i> , Qiagen, Hilden
LE392	<i>e14⁻(McrA⁻) supE44 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i> , Stratagene, Heidelberg

2.1.11 Phagen

λ FixIIPhage-Sema4g	Der λ FixII Phage enthält die genomische Sequenz von <i>Sema4g</i> und wurde freundlicherweise von Dr. Staffan Bohm, University Umeå (Schweden) zur Verfügung gestellt.
-----------------------------	---

2.1.12 BAC

BAC-C1 und -C2	<i>bacterial artificial chromosome</i> ; enthält die genomische Sequenz von <i>Sema4b</i> und wurde von der Firma Genome Systems, USA, bezogen.
----------------	---

2.1.13 Zelllinien

HEK 293T	Humane Nierenfibroblasten-Zelllinie mit stabiler Integration des large T'-Antigens des SV-40 Virus. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Stefan Heller, Rockefeller University, New York, zur Verfügung gestellt.
----------	--

Cos-7 Nierenfibroblasten-Zelllinie aus der grünen Meerkatze
(ATCC, Best.-Nr.: CRL-1651)

2.1.14 Mäusstämme

NMR1 Harlan-Winkelmann, Borcheln
 CD-1 Harlan-Winkelmann, Borcheln
Sema3a^{+/-} Diese Mauslinie wurde freundlicherweise von Dr. Jost Verhaagen, Amsterdam (Holland) zur Verfügung gestellt (Taniguchi et al., 1997).
or37a^{tauLacZ} Diese Mauslinie wurde freundlicherweise von Dr. Jörg Strotmann, Universität Hohenheim, zur Verfügung gestellt (Strotmann et al., 2000).

2.1.15 Rattenstämme

Wistar Ratten Harlan Winkelmann, Borcheln

2.1.16 Plasmide und Expressionkonstrukte

Die Plasmide, die für Klonierungen in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Plasmid	Größe	Eigenschaften	Referenz
pBK-CMV	4,5 kb	Neo ^r , Kana ^r , G418 ^r	Stratagene
pBlueskript SK+	2,9 kb	Amp ^r	Stratagene
pGEX-4T-2 (27-4581-01)	4,9 kb	Amp ^r	Amersham Pharmacia
pACN	6,6 kb	Amp ^r	Bunting et al., 1999
pIRES-EGFP	5,3 kb	Kana ^r	Fiore und Püschel, unpubliziert

pEasy Flox	3,8 kb	Amp ^r	Alamzhianov, unpubliziert
pEGFP-C1 (-NotI)	4,7 kb	Kana ^r	modifiziert, Fiore und Püschel, unpubliziert
pEGFP-Sema3A	4,7 kb	Kana ^r	Probst und Püschel, unpubliziert
pQE30	3,4 kb	Amp ^r	Qiagen

Tabelle 2: Verwendete Plasmide. Die Expressionsvektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Labornummer	Plasmide	Referenz
284	pBK-CMV	Stratagene
860	pEGFP-C2	Clontechh
817	pBK-HA-Nrp-1	Rohm et al., 2000
948	pBK-HA-Nrp-2(b0)	Rohm et al., 2000
832	pBK-Flag-Sema4B	Püschel et al., 1995
841	pBK-Flag-Sema4B Δ cyt	Püschel, unpubliziert
842	pBK-VSV-Sema4B	Püschel, unpubliziert
1412	pBK-Flag-Sema4B Δ PDZ	diese Arbeit
1386	pBK-EGFP-Sema4B Δ N	diese Arbeit
1332	pBK-myr-EGFP-Sema4Bcyt	diese Arbeit
1417	pQE30-Sema4Bcyt	diese Arbeit
785	pBK-Flag-Sema4C	Püschel et al., 1995
792	pBK-Flag-Sema4C Δ cyt	Püschel, unpubliziert
1418	pQE30-Sema4Ccyt	diese Arbeit
818	pBK-VSV-Sema4E	Püschel, unpubliziert
1028	pBK-VSV-Sema4F	Püschel, unpubliziert
1032	pBK-Flag-Sema4F	Püschel, unpubliziert
993	pBK-Flag-Sema4G	Püschel, unpubliziert
994	pBK-VSV-Sema4G	Püschel, unpubliziert
623	pBK-Flag-Sema5A	Adams et al., 1996
895	pBK-myc-GIPC1	Püschel, unpubliziert
921	pBK-myc-GIPC2	Püschel, unpubliziert
926	pBK-myc-PICK1	Püschel, unpubliziert
913	pBK-myc-PTP-BL1 (2+3)	Püschel, unpubliziert
920	pBK-myc-PTP-BL1 (4+5)	Püschel, unpubliziert
922	pGWI-myc-PSD-95	Garner et al., 2000
968	PBK-myc-S-Scam	Roth, unpubliziert

1016	pBK-myc-SAP97	Püschel, unpubliziert
1017	pBK-myc-SAP102	Püschel, unpubliziert
1248	pEGFP-ProSAP1	Boeckers et al., 1999
1265	pEGFP-ProSAP2 PDZ 2-3 (SAM)	Boeckers et al., 1999
1266	pEGFP-ProSAP2 PDZ 2-3 KPN	Boeckers et al., 1999
1352	pACN ^{EASY}	diese Arbeit
1416	<i>Sema4g</i> Targeting Vektor	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete Expressionsvektoren. Fusionsproteine, cDNA's mit vollständigem Leserahmen und Mutanten zur eukaryotischen Expression wurden in die Vektoren pBK-CMV, pEGFP-C1 und pEGFP-Sema3A kloniert, die eine Expression unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors ermöglichten. Konstrukte zur bakteriellen Expression für GST- und 6XHis-Fusionsproteine wurden in den pGEX-4T-2- bzw. pQE30-Vektor kloniert. Genomische Sequenzen des *Sema4g*-Lokus wurden in den Targeting Vektor pACN^{EASY} kloniert.

2.1.17 Synthetische Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
C1	P3	5' ATG GTT CTG ATA GGT GAG GCA TGG 3'	Genotypisierung
C2	P4	5' GTT CTG CTC CCG GCT CTA AAT CTC 3'	Genotypisierung
C3	Sem4C_3	5' GT <u>TGTCGAC TCA</u> TAC TGA AGA CTC CTC TGG 3'	Klonierung
C4	Sema4B_5	5'GTG CAT GCC GGC GA CTT CGA GAA GAG CTA 3'	Klonierung
C5	Sema4G_3	5' GTT GTC GAC TCA GAC AGA GCT CTC GTC TAG 3'	Klonierung
C6	Sema4G_5	5' GTG GAT CCA GAC GAG GTC GAA GAC GAA AA 3'	Klonierung
C7	Sem4B_3	5' GT <u>TGTCGAC TCA</u> TAC CAC AGA GTC TCG GAT TCT 3'	Klonierung
C8	Sem4B_5	5'GT <u>GGATCC</u> CAT CGG GAT GGC ATG AAA CTC 3'	Klonierung
C55	G3A	5' AAG AAG GCC TTC TCC ACC TG 3'	Genotypisierung
C56	G63	5' AAG GCT ATG CTG AAT GAT TGA 3'	Genotypisierung
C57	797	5' TGG AGC CCG TCA GTA TCG GC 3'	Genotypisierung
C89	4B_Del	5'GTCGCCGGCGTCATACCACAGAGTCTCGGAT TCT 3'	Klonierung
C92	4B_DEL	5' GT CGCCGGCGTCAGTCTCG BAT TCT CAG AGC CTA 3'	Klonierung
C93	4B_Del	5'TCG AAT GAA TTC CTG GTG ATG TGT ACT 3'	Klonierung
C94	4B_KpnI	5' GAACCACGCTGATGGTACCCAGTCAT 3'	Klonierung

C95	4B_XHO	5' GT CTCGAG GTCTCGGATCTCAGAGCC 3'	Klonierung
-----	--------	------------------------------------	------------

Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Synthetische Oligonukleotide wurden entweder zur Genotypisierung von *Sema3a*- oder *or37a^{tauLacZ}*-Mauslinien oder zur Konstruktion von Expressionkonstrukten verwendet. Sequenzierungen wurden mit Standardprimern (T3, T7, Uni, Rev) durchgeführt.

2.1.18 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Maus α -Flag M2, monoklonal, F3165	IF: 1:10000 IB: 1:10000 IP: 1:5000	Sigma, Steinhausen
Maus α -Myc, monoklonal, 1667149	IF: 1: 500 IB: 1:2000 IP: 1:500	Roche Diagnostics, Mannheim
Kanichen α -Myc, polyklonal, PRB-150P	IF: 1:500	Babco, Richmond, CA, USA
Ratte α -HA, monoklonal, 1867423	IF: 1:500 IB: 1:330	Roche Diagnostics, Mannheim
Maus α -VSV, monoklonal, 1667351	IF: 1:500 IB: 1:500 IP: 1:500	Roche Diagnostics, Mannheim
Maus α -GFP, monoklonal, MMS-118P	IF: 1:2000 IB: 1:5000	Babco, Richmond, CA, USA
Ziege α -GST, polyklonal, 27-4577-01	IB: 1:4000	Amersham Pharmacia, Freiburg
Maus α -PSD-95, monoklonal, MAB-046	IF: 1:200 IB: 1:500	ABR, Alexis, Göttingen
Maus α -NDMR-1, monoklonal MAB363	IF: 1:250	Chemicon, Hofheim
Kaninchen α -NDMR-1, polyklonal, AB1516	IF: 1:250	Chemicon, Hofheim
Kaninchen α -Synaptophysin-1, monoklonal	IF: 1:100	Roche Diagnostics, Mannheim
Meerschweinchen α -ProSAP1, polyklonal	IF: 1:2000 IB: 1:2000	Boeckers et al., 1999
Kaninchen α -ProSAP1, polyklonal	IF: 1:2000 IB: 1:2000	Boeckers et al., 1999
Maus α -Bassoon, monoklonal	IF: 1:250	tom Dieck et al., 1998
Kaninchen α -Sema4B, polyklonal	IF: 1:2000 IB: 1:2000 IP: 1:500	eigene Herstellung
Kaninchen α -Sema4C, polyklonal	IF: 1:4000 IB: 1:3000 IP: 1:500	eigene Herstellung
Kaninchen α -GIPC1, polyklonal	IF: 1:300 IB: 1:200	von M. Simmons
Kaninchen α -Neuropilin-1, polyklonal, PC-343	IF: 1:100	Oncogene, Calbiochem, Schwalbach

Kaninchen α -Neuropilin-2, polyklonal, AF567	IF: 1:200	R&D-System, Wiesbaden
Ratte α -Pecam-1 (CD31), polyklonal, 553370	WM: 1:40	PharMingen Int., San Diego, USA
Maus α -Aktin, monoklonal, MAB 99874	IB: 1:100	Chemicon, Hofheim
Ziege α -Maus, Peroxidase gekoppelt, 115035003	IB: 1:10000	Dianova, Hamburg
Ziege α -Ratte, Peroxidase gekoppelt, 2013819	IB: 1:10000 WM: 1:400	Roche Diagnostics, Mannheim
Ziege α -Kaninchen, Peroxidase gekoppelt, 705095147	IB: 1:10000	Dianova, Hamburg
Ziege α -Maus, Alexa Fluor 488, A-11010	IF: 1:1000	MoBiTec, Göttingen
Ziege α -Maus, Alexa Fluor 350, A-11001	IF: 1:1000	MoBiTec, Göttingen
Ziege α -Maus, Alexa Fluor 594, A-11005	IF: 1:1000	MoBiTec, Göttingen
Ziege α -Meerschweinchen, Alexa Fluor 594, A-11076	IF: 1:1000	MoBiTec, Göttingen
Ziege α -Kaninchen, Alexa Fluor 488, A-11008	IF: 1:1000	MoBiTec, Göttingen
Ziege α -Kaninchen, Alexa Fluor 594, A-11012	IF: 1:1000	MoBiTec, Göttingen
Rhodamine-Phalloidin, 300 U, R-415	IF: 1:300	MoBiTec, Göttingen

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper. Die in dieser Tabelle aufgeführten Antikörper wurden für indirekte Immunfluoreszenz (IF), Immunoblot (IB)-Analysen, Immunpräzipitationen (IP) und *Whole Mount*-Analysen (WM) verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die meisten in diesem Kapitel beschriebenen Methoden sind, soweit nicht anders aufgeführt, Variationen der in Sambrook et al. (2000) beschrieben.

2.2.1 Präparative Methoden

2.2.1.1 Isolierung von DNA durch alkalische Lyse

Die alkalische Lyse ist eine schnelle und einfache Methode zur Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli*. Die durch alkalische Lyse gewonnene DNA eignet sich zur

Analyse durch Restriktionsverdau oder Hybridisierungen. 1,5 ml Übernachtskulturen (LB+Antibiotikum) wurden 1 min bei 132000 rpm in einer Eppendorf (Biofuge) zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung B wurde der Ansatz gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur bis zur Lyse der Bakterien inkubiert. Anschließend wurde 150 µl eisgekühlte Lösung C hinzugefügt, gründlich invertiert und der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine 5-minütige Zentrifugation in einer Biofuge bei Raumtemperatur, bei der denaturierte Proteine und genomische DNA pelletiert wurden. Der klare Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml eisgekühltem 100 % Ethanol und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurde die DNA gefällt und anschließend durch eine weitere Zentrifugation (13200 rpm, 10 min) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und zur weiteren Verwendung in 10-50 µl TE + RNase gelöst.

2.2.1.2 Isolierung von DNA über QIAwell-Säulen

Diese Verfahren liefert hochreine DNA, die für die Sequenzierung und Transfektion geeignet ist. Für eine DNA-Präparation wurden die Bakterien aus 5 ml Übernachtskultur (LB+Antibiotikum) durch zwei Zentrifugationen (8000 rpm, 1 min, Biofuge) in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert und in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 300 µl Puffer 2 versetzt, mehrfach invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 3 und Invertieren wurde das Gefäß für 10 min auf Eis gestellt und 15 min in einer Biofuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, auf die Säulen eines QIAwell-8 Streifen gegeben und mittels QIAvac-Vakuuvorrichtung (Manifold 6) durch das Säulenmaterial gesaugt. Die an die Matrix gebundene DNA wurde dreimal mit 1 ml QC-Puffer gewaschen, mit 500 µl QF-Puffer in ein Sammelröhrchen eluiert und schließlich mit 350 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation von 30 min in einer Biofuge bei RT wurde das Präzipitat mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und für weitere Anwendungen in 10-50 µl H₂O gelöst.

2.2.1.3 Isolierung von DNA im präparativen Maßstab

Die Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden die plasmidtragenden Bakterien über Nacht in LB-Medium mit Antibiotikum inkubiert und am nächsten Morgen bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert (4 °C, GSA-Rotor, Sorvall). Das Pellet wurde in Puffer 2 lysiert, 5 min in Puffer 2 alkalisch lysiert und nach Zugabe von Puffer 3 30 min auf Eis inkubiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte an Affinitäts-Säulen mit Hilfe von Tip100 oder Tip500-Säulen.

2.2.1.4 Präparation von genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach einem vereinfachten Protokoll von Laird et al. (1991) gewonnen. Bei diesem Verfahren wurde die Spitze eines Mausschwanzes oder eukaryotische Zellen mit 500 µl tail-Puffer versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach dem Verdau der Proteine wurden die löslichen Reste bei 13000 rpm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß transferiert, die genomische DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt und 15 min bei 13200 rpm pelletiert. Das Präzipitat wurde in 250 µl 70% Ethanol gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA in 300 µl TE-Puffer aufgenommen und 15 min zur vollständigen Lösung bei 55°C inkubiert. Die Lagerung genomischer DNA erfolgte bei 4 °C.

2.2.1.5 Präparation von BAC-DNA

Zur Gewinnung genomischer DNA aus *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) wurde nach dem Protokoll von Genome Systems verfahren. Die Bakterien aus einer 500 ml Übernachtskultur wurden bei 5000 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde in 24 ml TES resuspendiert und die Bakterien mit 25 ml Puffer B lysiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden 24 ml 3 M KAc hinzugefügt und die Lösungen durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Danach wurde das Gemisch kurz auf Eis inkubiert und 20 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Filter gegeben und der Durchfluß zweimal mit Phenol extrahiert. Die wässrige Lösung wurde mit einem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, und die DNA 30 min bei 4 °C präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und dann in 1 ml TE resuspendiert. Die gereinigte BAC-DNA konnte dann bei 4 °C gelagert werden.

2.2.1.6 Präparation von Phagen-DNA

Die Präparation von genomischer DNA aus Phagen erfolgte mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Hierzu wurden zunächst LE392 Bakterien mit 5×10^4 pfu λFixII Phagen infiziert und auf LB-Platten ausgestrichen. Nach der Bildung von Plaques wurden die lysierten Bakterien mit 10 ml 10 mM MgSO₄ eluiert und der Überstand für die weitere Gewinnung der genomischen Phagen-DNA verwendet. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion

Die Genotypisierung von *Sema3a* Mutanten und *Or37a^{taulacZ}*-Mauslinien oder die Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primer für spätere Klonierungsreaktionen wurde mittels PCR durchgeführt. Die Annealing-Temperatur des PCR-Programmes wurde in Abhängigkeit des Schmelzpunktes der Primersequenzen gewählt. Für eine analytische PCR wurden jeweils 1 µl Lösung der in 2.2.1.4 beschriebenen Methode gewonnene genomischer DNA, 2µl Reaktionspuffer, 1 µl 10 mM dNTP-Gemisch, jeweils 1 µl des 5'- und 3' Primers (10 pmol/µl), 1mM MgCl₂ und 0,5 µl Taq-Polymerase (1 U/µl; Gibco-Invitrogen) gemischt und mit Aqua bidest auf 20 µl aufgefüllt.

Für die präparative Herstellung von Fragmenten durch PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 100 µl mit 500 ng DNA, 5 µl Reaktionspuffer, je 2 µl 5'- und 3'-Primer (10 pmol/µl), 1 µl dNTP-Gemisch und 2,5 U Polymerase (Advantage Taq 2-Polymerase, Clontech) verwendet.

Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt, und es wurden in der Regel 36-40 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Polymerasereaktion durchlaufen. Tabelle 6 fasst die am häufigsten verwendeten Programme zusammen.

	Programme		
	Sema3A-PCR	tauLacZ	CB_3_clone
Denaturierung	94 °C für 5 min	94 °C für 5 min	94 °C für 5 min
Denaturierung	94 °C für 1 min	94 °C für 1 min	94 °C für 1 min
Annealing	62 °C für 30 sec	64 °C für 30 sec	54 °C für 30 sec
Elongation	72 °C für 2 min	72 °C für 2 min	68 °C für 2 min
Elongation (im Anschluss an letzten Zyklus)	72 °C für 10 min	72 °C für 10 min	68 °C für 10 min
Zyklenzahl	36	36	40
Produkt	1,3 kb +/- 600 bp -/-	337 bp +/- 250 bp -/-	na

Tabelle 6: PCR-Programme.

Zur Kontrolle und Auswertung der PCR wurden anschließend 10 µl der Ansätze elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt.

2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente (PCR-Produkten oder Plasmid-DNA) von Proteinen, RNA, Salzen und Nukleotiden zu reinigen, wurde ein Verdau oder PCR-Ansatz zunächst in einem Ethidiumbromid-Agarosegel geeigneter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Die ge-

wünschte Bande wurde ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem QIAex Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Diese Methode beruht auf der Auflösung der Agarose in Anwesenheit von Natriumiodid und der Bindung der DNA an Glasmilch unter leicht sauren Bedingungen. Anschließend wurde die DNA durch einen alkalischen Puffer wieder in Lösung gebracht. Alternativ wurde das Gelstück in ein zur Hälfte mit Plastikwolle gefülltes 0,5-ml-Reaktionsgefäß mit durchbohrtem Boden überführt und in flüssigem Stickstoff für 5 min gefroren. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Durch Zentrifugation bei 3000 g für 10 min gelangte die zu isolierende DNA in das untere Reaktionsgefäß, während die Agarose durch die Plastikwolle zurückgehalten wurde. Die auf diese Weise isolierte DNA konnte direkt zur Ligation eingesetzt werden.

2.2.1.9 Phenol-Extraktion von DNA

Mit der Phenolextraktion werden Proteine aus der DNA-Lösung entfernt. 300 µl DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach Mischung wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 15000 g für 5 min getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und gefällt.

2.2.1.10 Reinigung und Konzentration von DNA aus wässrigen Lösungen

Zur Fällung der DNA aus einer wässrigen Lösung wurde diese mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. 100 % Ethanol (RT) versetzt, gemischt und 30 min bei -20°C gefällt. Die Präzipitation erfolgte durch 15 min Zentrifugieren (15000 g). Der Niederschlag wurde mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, nach erneutem Zentrifugieren an der Luft oder im Vakuumtrockner getrocknet, und das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen H_2O bzw. Puffer aufgenommen wurde. Die Fällung kann mit 1 Vol. Isopropanol anstelle von 2,5 Vol. Ethanol durchgeführt werden.

2.2.2 Analytische Methoden

2.2.2.1 DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsverdaue von Plasmiden und PCR-Produkten wurden unter den Bedingungen durchgeführt, die vom Hersteller des jeweiligen Enzyms angegeben wurden. In der Regel wurde die DNA mit 1/10 Volumen Restriktionspuffer und 2 bis 10 Units pro µg DNA inkubiert. Das Volumen des eingesetzten Enzyms betrug maximal 1/10 des Endvolumens. Der

Restriktionsverdau wurde für 2 bis 12 Stunden bei geeigneter Temperatur durchgeführt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Proben wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gemessen. Für doppelsträngige DNA entspricht eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung der Nukleinsäureprobe durch Proteine. Für reine Nukleinsäuren sollte der Quotient OD_{260}/OD_{280} Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen.

2.2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die präparative und analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Molekulargewichte erfolgte unter nativen Bedingungen in Agarose-Flachbrett-Gelen. Um eine optimale Auftrennung der DNA-Fragmente zu erzielen, wurde die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 1,4 % variiert. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 0,5 X TBE verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose mit 0,5 X TBE-Puffer in einem Mikrowellengerät schlierenfrei aufgekocht, und die Agarosegellösung in eine abgedichtete Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6X Ladepuffer versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 10-15 V/cm^2 und dauerte je nach Gelgröße 1-2 Stunden. Anschließend wurde das Gel für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (10 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt und auf einem UV-Transilluminator zur Dokumentation fotografiert.

2.2.2.4 Nukleinsäuretransfer

Southern-Blot

Zur Analyse genomischer DNA wurde die von Southern entwickelte Transfer-Methode verwendet (Southern et al., 1975).

Genomische BAC-, Phagen- oder Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse enzymatisch verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine partielle Depurinierung der DNA durch Behandlung des Gels in 0,25 N HCl (10 min). Zur Denaturierung und Neutralisierung wurde das Gel in Transferpuffer überführt. Die DNA wurde dann über Nacht mittels Kapillarkräften unter Verwendung des Transferpuffers auf eine Nylon-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran 5 min in Neutralisierungspuffer inkubiert und zur Immobilisierung der DNA 10 min im UV-Crosslinker behandelt.

Kolonie-Hybridisierung

Diese Technik basiert auf einem abgewandelten Verfahren von Grunstein und Hogness (1975) und erlaubt die Analyse von Plasmiden in Bakterienkolonien. Nach dem Wachstum der Bakterien auf festen Medien wurde durch Auflegen von Nylon-Membranen Replikate erzeugt. Zur Lyse der Bakterien und zur Denaturierung der DNA wurden die Membranen nacheinander 3 min in einem Mikrowellengerät auf einem mit 2X SSC durchtränkten Whatmann 3MM Papier inkubiert. Die luftgetrockneten Filter wurden zur Fixierung der DNA im Stratalinker mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt.

2.2.2.5 Herstellung von radioaktiv markierten Sonden und Hybridisierung

DNA-Sonden wurden mit Hilfe des Ready-to-go-Labeling Kits nach Anleitung des Herstellers radioaktiv markiert. Dazu wurden 200 ng DNA in 45 µl Wasser durch 3-minütige Inkubation bei 94 °C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden dem Ansatz 5 µl (50 µCi) [α -³²P] dCTP zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die radioaktiv markierte Sonde über Pharmacia Micro-Spin-Columns aufgereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen. Die Membran wurde kurz in 2X SSC angefeuchtet und anschließend mit 15 ml der Prähybridisierungslösung für 2 h bei 65 °C inkubiert. Nach Denaturierung der markierten Proben durch kurzes Aufkochen wurde die Sonde zum Prähybridisierungsmix hinzugefügt und über Nacht bei 65 °C inkubiert.

Nach der Hybridisierung über Nacht wurden die Filter kurz in 2X SSC, 0,1% SDS bei RT gespült und dann zweimal für 20 min mit 2X SSC, 0,1% SDS bei 42 °C bis 65 °C gewaschen. Nach zwei weiteren Waschsritten mit jeweils in 1X SSC, 0,1% SDS und in 0,1X SSC, 0,1% SDS für 20 Minuten wurden die Membranen zum Abtropfen kurz auf Whatmann 3MM Papier gelegt, in Frischhaltefolie verpackt und nach Auflegen eines Röntgenfilms zur Autoradiographie in einer Expositionskassette bei -70°C für 1-4 Tage gelagert. Alternativ wurden die in Frischhaltefolie verpackten Membranen auf eine Phosphoimager-Screen gelegt und nach 1-16 Stunden mit einem Fuji-Bas 1000 ausgewertet.

2.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode (Sanger et al., 1977). Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem automatischen Sequenziergerät (Applied Biosystems 373A DNA Sequencer) unter der Verwendung eines geeigneten Sequencer Kits (Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) durchgeführt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Analyse der Sequenzen erfolgte in der Regel mit Hilfe der Programme MacVector, DNA-Star oder DNA-Strider.

2.2.3 Klonierungstechniken

2.2.3.1 Dephosphorylierung von DNA

Die Entfernung der endständigen 5'-Phosphatgruppe dient zur Vermeidung der intramolekularen Ligation von linearisierten Plasmidvektoren. Dazu wurden 20 µl einer Restriktionsreaktion mit 2,4 µl zehnfach konzentriertem Phosphatasepuffer und 1,6 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm versetzt und 1 h bei 56 °C inkubiert.

2.2.3.2 Phosphorylierung und Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden (*„fill in“*)

Bevor überstehende Enden von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten mit glatten Enden eines linearisierten Vektors ligiert werden können, müssen diese zunächst aufgefüllt und phosphoryliert werden. Durch PCI-Extraktion und Fällung aufgereinigte PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente wurden in 13 µl H₂O aufgenommen, mit 4 µl T4-DNA-Polymerase-Puffer, 2 µl Polynukleotidkinase (PNK)-Puffer, 2 µl dATP/ 10 mM dNTP, 0,5 µl T4-DNA-Polymerase und 0,5 µl PNK versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Aufgefüllte Restriktionsfragmente und PCR-Produkte wurden anschließend über eine Agarosegel aufgetrennt, eluiert, gereinigt und dann ligiert.

2.2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines Vektors mit einem Passagierfragment wird durch die DNA-Ligase katalysiert. Dieses Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch eine 3'-OH- mit einer 5'-Phosphat-Gruppe kovalent unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Für den Einbau von einem oder mehreren DNA-Fragmenten in einen Vektor wurden 7 µl einer DNA-Fragment-Lösung (200 ng DNA), 1 µl des linearisierten und ggf. dephosphorylierten Vektors (etwa 50 ng DNA) und 1 µl Ligase-Puffer gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl) gestartet und für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.3.4 Kultivierung von Bakterien

Die *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agar-Platten bei 37 °C angezogen. Für die Aufzucht plasmidtragender Stämme wurden entsprechende Selektionsmedien verwendet, für Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und 6 h bzw. über Nacht im

Schüttelinkubator bei 220 UpM und 37 °C inkubiert. Bakterienkolonien wurden auf Agarplatten bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt. Dazu wurde Glycerin zu Endkonzentration von 20 % (v/v) zu einer Übernachtskultur gegeben und diese eingefroren. Um eine Kultur aus einer Glycerinkultur anzuzüpfen wurde etwas tiefgefrorenes Material mit einem sterilen Glasstab entnommen, in ein geeignetes Volumen Flüssigmedium überführt und bei 37 °C über Nacht unter schütteln inkubiert.

2.2.3.5 Herstellung von kompetenten Zellen für die Elektroporation

Die höchste Transformationseffizienz erhält man mit Zellen, die in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und durch mehrfaches Waschen in ein Medium möglichst geringer Ionenstärke überführt werden.

Eine 1000 ml Bakterienkultur in exponentieller Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6-0,7$) wurde nach 30 min Abkühlen auf Eis bei 5000 x g und 4 °C für 15 min sedimentiert, in 500 ml sterilem eisgekühltem Wasser resuspendiert und wie zuvor pelletiert. Dies wurde wiederholt und die Zellen jeweils in 250 ml Wasser bzw. in 50 ml und schließlich 5 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und darauf folgend in 50 µl-Portionen aliquotiert. Nach Schockgefrieren bei -196 °C wurden diese bei -70 °C gelagert.

2.2.3.6 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Hitzeschocktransformation

Hierbei wurden die Bakterien wiederum während der exponentiellen Phase geerntet. Eine 1000 ml-Bakterienkultur in exponentieller Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6-0,7$) wurde im Eisbad 30 min abgekühlt und durch Zentrifugation bei 4000 g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, anschließend mit 20 ml eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ gewaschen, erneut sedimentiert (4000 g, 4 °C, 5 min), in 10 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4000 g für 5 min bei 4 °C wurde das Bakteriensediment in 2,5 ml 100 mM $CaCl_2$ /15 % Glycerin (v/v 4 °C) aufgenommen und die Zellsuspension in 100 µl-Portionen in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Nach Schockgefrieren bei -196 °C wurden die Bakterien bei -70 °C gelagert.

2.2.3.7 Transformation durch Elektroporation

Elektroporation ist eine hocheffiziente Methode zur Transformation einer Vielzahl verschiedener Bakterienspezies. Wie in Dower et al. (1988) beschrieben, erreicht man bei *E.coli* eine Transformationsrate von 10^{10} Transformanden pro µg Plasmid-DNA. Die bei der Elektro-

poration erzeugte lokale Desorganisation der Bakterienmembran erlaubt die Aufnahme von Plasmiden und anderen hochmolekularen Stoffen. Ein Aliquot kompetente Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-2 μ l Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde dann in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand überführt und im BIO-RAD Micro-Pulser elektroporiert (Programm EC1: 1,8 kV). Anschließend wurde die Zellsuspension in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand bis auf 100 μ l abgenommen, die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert, auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.8 Transformation durch Hitzeschock

100 μ l kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit bis zu 500 ng Plasmid-DNA oder 10 μ l eines Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s auf 42 °C erwärmt und nach dem Hitzeschock auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium wurde die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l des Ansatzes auf einem Selektions-Medium ausgestrichen. Bei Transformation eines Ligationsansatzes wurden die Bakterien zunächst durch Zentrifugation bei 4000 g für 5 min sedimentiert, 800 μ l des Überstandes wurde verworfen, die Bakterien im verbliebenen Medium resuspendiert und der gesamte Transformationsansatz auf einem Selektionsmedium ausgestrichen. Die Agarplatte wurde für 12 bis 16 h bei 37 °C inkubiert

2.2.4 Konstruktion von Sema4B Deletionsmutanten

Die Expressionsvektoren für Flag- oder GFP-Fusionsproteine von Sema4B-Deletionsmutanten wurden auf der Basis der Plasmide pBK-CMV und pEGFP-Sema3A (Probst und Püschel, unpubliziert) konstruiert (s. Abb. 25 A). Um den Expressionsvektor pBK-Flag-Sema4B Δ cyt herzustellen, wurde pBK-Flag-Sema4B mit den Restriktionsenzymen BamHI/XhoI verdaut, um die zytoplasmatische Domäne zu isolieren. Nach elektrophoretischer Auflösung wurde das Vektorrückgrad mit der extrazellulären und Transmembran-Domäne isoliert und ligiert. Zur Konstruktion von pBK-Flag-Sema4B Δ PDZ wurde die Sequenz, die für Transmembran- und zytoplasmatische Domäne kodiert, mittels PCR amplifiziert und in die EcoRV-Schnittstelle von pBS KS+ (Stratagene) kloniert. Dabei wurden die Primer so gewählt, daß die kodierende Region für die letzten drei AS deletiert wurden. Aus diesem Vektor wurde ein KpnI/XhoI-Fragment isoliert und in pBK-Flag-Sema4B ligiert. Die cDNA, die für die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne kodiert, wurde mittels PCR amplifiziert und in den pEGFP-Sema3A-Vektor ligiert. Zur Konstruktion von pBK-myr-GFP-

Sema4Bcyt wurde die Sequenz für Transmembran- und die zytoplasmatische Domäne durch einen BglII/NotI-Verdau aus pBK-Flag-Sema4B isoliert und in myr-GFP-Sema4A-Vektor kloniert.

2.2.5 Generierung des *Sema4g* Targeting-Vektors

Für die Herstellung des *Sema4g* Targeting-Vektors wurde pIRES-EGFP-N1 Vektor verwendet, in dem die NotI-Schnittstelle von pIRES-EGFP (Clontech) zerstört ist (Fiore und Püschel, unpubliziert). Ein XhoI/PmlI des 11-1Subklon wurde in die XhoI-Schnittstelle von pIRES-EGFP^{ANotI} kloniert (Abb. 7 A), das das 5'-Ende des *Sema4g* Locus enthält. Die ACN-Kassette wurde über einen EcoRI/SalI-Verdau isoliert, aufgefüllt und in den durch BamHI/XhoI-geöffneten Vektor pEasyFlox kloniert. Die ACN-Kassette wurde relativ zur Transkriptionsrichtung von *Sema4g* in entgegengesetzter Orientierung kloniert. Die zur Überprüfung der korrekten Integration in das Genom benötigte XhoI-Schnittstelle wurde durch eine PCR zwischen die SfiI- und NotI-Schnittstelle eingefügt. Dabei wurde darauf geachtet, daß das Leseraster von *Sema4g* nicht verändert wurde. Der pEasyFlox-Vektor wurden wegen seiner Schnittstellen und der vorhandenen Thymidin-Kinase (tk)-Kassette verwendet, die für die Negativ-Selektion in ES-Zellen benötigt wird. (Abb. 7 B).

Anschließend wurde die 5'-*Sema4g*-IRES-GFP-Kassette als ein XhoI/AflIII-Fragment in die aufgefüllte NotI-Schnittstelle des pEasyFlox^{ACN}-Vektors ligiert (Abb. 7 C). Um das 3'-Ende des *Sema4g*-Locus in den Vektor einzuführen, wurde ein 4,4 kb SpeI-Fragment aus dem 10-11-Subklon in die aufgefüllte EcoRI-Schnittstelle von pEasyFlox^{ACN} + 5' *Sema4g*-Vektor kloniert (Abb. 7 D).

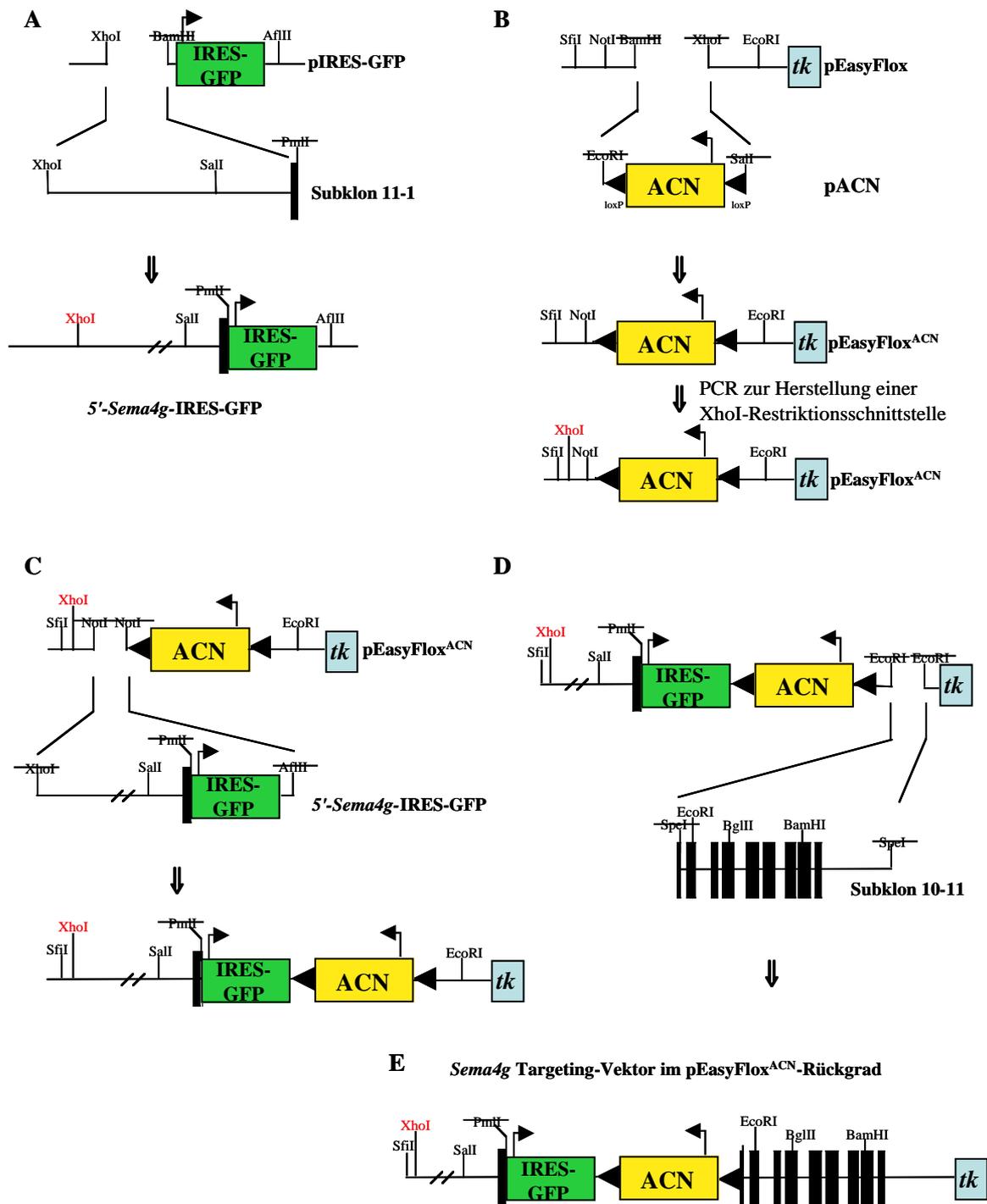


Abb. 7: Schematische Darstellung der Generierung des *Sema4g* Targeting-Vektors. Zur Klonierung wurden teilweise Schnittstellen durch T4-Polymerase aufgefüllt und dadurch zerstört. **(A)** Zunächst wurde ein XhoI/PmlI-Fragment, das das 5'-Ende des *Sema4g* Lokusses enthält, in pIRES-EGFP^{ΔNotI} kloniert. **(B)** Die ACN-Kassette wurde durch EcoRI/SalI isoliert, aufgefüllt, und in pEasyFlox kloniert. Anschließend wurde mittels PCR im pEasyFlox^{ACN} eine XhoI-Schnittstelle eingeführt, die zur Überprüfung der korrekten Integration benötigt wird. **(C)** Das 5'-*Sema4g*-IRES-EGFP^{ΔNotI} wurde als ein XhoI/AflIII-Fragment in die aufgefüllte NotI-Schnittstelle des pEasyFlox^{ACN} kloniert. **(D)** Ein 4,4 kb SpeI-Fragment aus dem Subklon 10-11, der das 3'-Ende von *Sema4g* beinhaltet, wurde in den pEasyFlox^{ACN} + 5'-*Sema4g*-IRES-EGFP^{ΔNotI}-Vektor kloniert. In **(E)** ist der Targeting-Vektor dargestellt. Der Targeting-Vektor kann mit dem Restriktionsenzym SfiI linearisiert werden. Alle Klonierungsschritte wurden durch Sequenzierung, Southern Blot oder Koloniehybridisierung überprüft. Exons sind als schwarze Balken dargestellt. ACN = ACN-Kassette (beinhaltet kodierende Sequenz für Neomycin⁺ Kassetten und Cre-Rekombinase); tk = Thymidin-Kinase.

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Aufreinigung und Analyse rekombinanter Membran- und membranassoziierter Proteine wurden transfizierte Zellen in 1 ml eiskaltem PBS geerntet und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 3000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in 300-400 µl Lysispuffer 1 (für Immunpräzipitation) oder 1 ml TLB-Puffer (für *Pulldown-Assay*) lysiert. Hierzu wurde der Ansatz durch Pipettieren gemischt und zur vollständigen Solubilisierung für 30 min bei 4 °C in einem Rotator inkubiert. Der Überstand nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C enthielt die zu analysierenden Proteine. Zellysate wurde entweder direkt weiter verwendet oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.3.2 Aufreinigung von Zellmembranen über einen Sucrose-Gradienten

Zehn Gehirne neugeborener Mäuse wurden in 0,5 ml 1X CMFH/ 1X PIC mechanisch homogenisiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend dreimal mit CMFH bei 4 °C gewaschen. Für die Waschschrte wurde das Homogenisat jeweils bei 6000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Um das Zytoplasma und die Zellkerne von der Membranfraktion zu trennen, wurden die aufgeschlossenen Zellen mit 1 ml 2,25 M Sucrose in PBS versetzt und vorsichtig mit 10 ml 2,25 M Sucrose/ PBS in einem Corex-Röhrchen überschichtet. Anschließend wurden die Membranpräparationen mit 3 ml 0,8 M Sucrose /PBS überschichtet. Nach einer Zentrifugation für 60 min bei 10000 rpm (Sorvall-Zentrifuge) bei 4°C waren die Membranen in einer weißlich angefärbten Bande im Gradienten angereichert und konnten mit einer Pipette abgenommen werden. Anschließend wurde diese Fraktion dreimal mit CMFH/ PIC bei 4 °C gewaschen und bei -70°C gelagert. Zur Gewinnung von membranassozierten Proteinen aus den so präparierten Zellmembranen wurden diese für 1 h mit 2 % Triton X-100, 2mM DTT, 1X PIC auf einem Rotator solubilisiert. Die solubiliserten Proteine wurden dann für eine Immunpräzipitation verwendet.

2.3.3 Kultivierung und Expression rekombinanter Proteine

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden M15-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid (pGEX-4T oder pQE30-Vektor) transformiert und am nächsten Morgen 500 ml LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin (50 µg/ml) mit 25 ml ÜN-Vorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde auf einem Schüttler bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und Inkubation für 5 h bei 37 °C und 160 rpm. Nach Abschluß der Inkubation wurden die Zellen für 15 min bei 6000 rpm (GSA-Rotor, Sorvall) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS gewaschen und in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4000 rpm (Megafuge 1.0 R, Heraeus) wurden die Zellen in 10 ml Lysispuffer 2 aufgenommen und bis zum anschließendem Aufschluß auf Eis gekühlt.

2.3.4 Aufschluß von Bakterienzellen

Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe einer *French Pressure Cell Press* (Thermo Spectronic). Diese wurde zunächst dreimal mit kaltem Wasser und dann mit etwas Bakterien-Lysispuffer gespült. Während des Aufschlusses wurden die Zellen mit 500 kPa aufgebrochen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um einen möglichst vollständigen Aufschluss zu gewährleisten. Anschließend wurden durch eine Zentrifugation von 30 min bei 16.000 rpm (SS34-Rotor, Sorvall) die Zellreste pelletiert. Der Überstand, welcher die löslichen Proteine enthielt, wurde aliquotiert und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70 °C gelagert.

2.3.5 Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose

Mit GST (Glutathion S-Transferase) fusionierte Proteine können durch Bindung an Glutathion-Sepharose immobilisiert werden. Für die Kopplung wurden 30 µl Glutathion-Sepharose einmal mit 1 ml PBS gewaschen, 1 min bei 2000 rpm pelletiert und anschließend mit einem das GST-Fusionsproteine enthaltenden Lysat (2.3.4) versetzt. Nach 1 h Inkubation auf einem Rotator bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Sepharose dreimal mit 1 ml TLB (s. 2.1.7.2) gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde 1 min bei 2000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Lagerung sollte bis zur Verwendung für den *Pulldown*-Assay bei 4 °C

und nicht länger als 3 Tage erfolgen.

2.3.6 Pulldown-Assay

Im *Pulldown*-Assay kann man gezielt die Interaktion zweier Proteine untersuchen. Hierzu wurde zunächst ein GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit dem Zellysat, das den zu untersuchenden potentiellen Bindungspartner enthält, versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde die Glutathion-Sepharose dreimal mit PD Waschpuffer gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die Matrix für 1 min bei 2000 rpm und 4 °C in einer Biofuge pelletiert. Anschließend wurde erneut für 2 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Durch Inkubation von 25 µl 1x SDS-Probenpuffer für 5 min auf einem Schüttler wurden die Proteine eluiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die weitere Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion.

2.3.7 Aufreinigung von His-gekoppelten bakteriell exprimierten Proteinen

Bakterien aus einer Zwei-Liter LB-Kultur (2.2.3.4) in Ni-NTA-Puffer B lysiert. Eine chromatographische Säule (2,5 ml Säulen, MoBiTEc) wurde mit 1,5 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) beladen und mit 5 Volumen Ni-NTA-Puffer C/ 20mM Imidazol äquilibriert. Das Lysat wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit 0,5 ml/ min auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluß wurde gesammelt und dreimal erneut aufgetragen. Danach wurde diese Matrix dreimal mit 5 Volumen Ni-NTA-Puffer D gewaschen. Das His-gekoppelte Protein wurde mit 0,5 ml Ni-NTA-Puffer E eluiert. Die Elution wurde achtmal wiederholt, die Durchflüsse vereinigt und bei -20°C gelagert.

2.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe des Bio-RAD DC Protein Assay Kits (Lowry-Methode). Hierbei wurde BSA als Standard benutzt.

2.3.9 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation können Proteinkomplexe z.B. aus Zellextrakten mit spezifischen Antikörpern gereinigt werden. Dabei werden die Antikörper über ihre Fc-Regionen an eine Matrix gekoppelt (Schneider et al., 1982). Als Matrix kann Protein-A Sepharose bzw. Protein-G Agarose dienen. Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern wurde in der Regel Protein-G Agarose als Matrix genutzt. Antigen und spezifisch gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert. Die Antikörper bleiben dabei weitgehend an der Matrix gebunden.

Für eine Immunpräzipitation wurden die transfizierten 293T Zellen von drei 10 cm-Kulturschalen mit insgesamt 10 ml gekühltem PBS geerntet und durch eine Zentrifugation für 2 min bei 4300 rpm (Megafuge 1.0 R, Hereaus) pelletiert. Ebenso wurde mit drei Kulturschalen untransfizierter Zellen verfahren. Die Zellen wurden jeweils in 200 µl gekühltem Lysis-Puffer 1 resuspendiert und für 30 min auf einem Rotator bei 4 °C inkubiert. Dem schloß sich eine 30minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C an. Für die Kontrolle der Proteinexpression wurden danach 20 µl Lysat mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20 °C gelagert. Alternativ wurden für den Nachweis von endogenen Proteinkomplexen 300 µl Membranpräparationen von neugeborenen Mäusen verwendet. Der Überstand wurde zunächst mit 3 µl α-Flag oder α-Sema4B-Serum und -Präimmun-Serum, oder 5 µl α-myc oder α-VSV-Antikörper für 5 h auf dem Rotator bei 4 °C inkubiert. Parallel dazu wurde Protein-G Agarose (30 µl pro IP-Ansatz) mit Lysaten von WT-Zellen inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Protein-G Agarose für 5 min bei 6000 rpm sedimentiert und der Überstand abgenommen. Zu der Agarose wurden die mit dem Antikörper versetzten Lysate der transfizierten Zellen gegeben und ÜN erneut auf dem Rotator bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag schloß sich zunächst eine Zentrifugation für 5 min bei 6000 rpm an. Die Protein-G Agarose wurde in fünf Waschschritten mit jeweils 400 µl gekühltem 0,5% Triton X-100/ PBS gewaschen und durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 1 min bei 4 °C in einer Biofuge pelletiert. Gebundene Proteine wurden dann mit 20 µl 1x SDS-Probenpuffer 5 min auf einem Schüttler eluiert und die Agarose in einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 13.000 rpm sedimentiert. Nach Denaturierung für 5 min bei 95°C erfolgte die weitere Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot.

2.3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; modifiziert

nach Shapiro *et al.*, 1967) dient der Auftrennung von denaturierten Proteinen. Die Proteine werden vor der Auftrennung durch Inkubation in einem SDS-haltigen Probenpuffer bei 95 °C denaturiert.

Für die SDS-PAGE wurden Trenngele mit 7,5% oder 10% Polyacrylamid und 4%igen Sammelgele verwendet. Pro Spur wurden 5-20 µg Protein („Minigele“ mit einer Schichtdicke von 0,75 mm) aufgetragen. Zur Bestimmung der Größen aufgetrennter Proteine wurden *High-* oder *Low Molecular Weight Marker* (Sigma) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in PAGE-Laufpuffer bei 20–30mA (bei 1 bzw. 2 Gelen). Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, wo spezifische Proteine mit Hilfe von Immundetektion nachgewiesen werden konnten. Alternativ wurde das Gel für 1 h mit Coomassie-Blau angefärbt (modifiziert nach Weber und Osborn, 1969) und anschließend unspezifisch gebundener Farbstoff für 3-12 h in Entfärbelösung entfernt.

2.3.11 Western-Blot (*semi-dry-Blot*)

Der elektrophoretische Transfer aufgetrennter Proteine von Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte nach Kyshe-Andersen in einer Horizontalblotkammer. Auf die Anodenplatte der Apparatur wurden 5 Schichten Whatman 3MM-Papier, die zuvor in Transferpuffer getränkt worden waren, aufgelegt und blasenfrei mit einer feuchten Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll), dem Polyacrylamidgel und 5 weiteren Lagen getränkten 3MM-Papiers überschichtet. Nach dem Auflegen der Kathodenplatte wurden die Proteine für 2 h bei einem Strom von 1 mA/cm² auf die Membranfläche transferiert. Der erfolgreiche Transfer wurde durch reversibles Anfärben der Nitrozellulose mit Ponceau S überprüft. Die Membran wurde dazu 5 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. entfärbt, bis die Proteine durch eine rote Färbung sichtbar waren.

2.3.12 Immundetektion von Proteinen

Für den Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern wurden je nach verwendetem Antikörper unterschiedliche Blocklösungen eingesetzt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern (Tab. 7). Vor der Immundetektion wurde die Membran für mindestens 1 h mit Blocklösung 1 oder 2 behandelt und anschließend mit einem in Blockpuffer verdünnten 1. Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundenen Antikörpers wurde die Membran dreimal für je 5 min mit PBS oder je 10 min mit PBS + 0,3% Tween-20 gewaschen. Zur Detektion des

Antikörper wurden die Membranen dann mit der Verdünnung eines geeigneten Antikörper-Peroxidase-Konjugats (2. AK) in Blocklösung 1 oder 2 für 1 h inkubiert und wie zuvor gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der 2. AK über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Membran für 2 min mit einem Gemisch der Detektions-Reagenzien 1 und 2 (1:1) des ECL-Systems gleichmäßig bedeckt. Nach dem Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen und die Chemolumineszenz-Signale für Zeitintervalle von 30 sec-30 min aufgenommen. Um anschließend zur Wiederverwendung des Blots die gebundenen Antikörper wieder von der Membran zu entfernen, wurde der Blot 15 min in PBS gewaschen und in "Stripping"-Puffer für 30 min in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS (10 min) konnte mit der üblichen Absättigungs-Reaktion für den nächsten Antikörper fortgefahren werden.

1. Antikörper	Verd.	2. Antikörper	Verd.	Blockpuffer
α -Flag M2	1: 10000	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blocklösung 1
α -HA	1: 500	Ziege α -Ratte HRP	1:10 000	Blocklösung 1
α -c-myc	1: 10 000	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blocklösung 1
α -VSV	1: 3 000	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blocklösung 1
α -GFP	1: 5 000	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blocklösung 1
α -GST	1: 4 000	Esel α -Ziege HRP	1:10 000	Blocklösung 2
α -Sema4B	1: 4 000	Ziege α -Kaninchen HRP	1:10 000	Blocklösung 2
α -Sema4C	1: 3 000	Ziege α -Kaninchen HRP	1:10 000	Blocklösung 2
α -PSD-95	1: 200	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blocklösung 1
α -Aktin	1: 200	Ziege α -Maus HRP	1:10 000	Blocklösung 1

Tabelle 7: Für die Westernblot-Analyse verwendeten primären und sekundären Antikörper. Ver. = Verdünnung.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden auf Trockeneis transportiert. Nach zügigem Auftauen bei 37 °C im Wasserbad wurden die Zellen in ein steriles 15 ml-Kulturröhrchen überführt und mit 10 ml Kulturmedium tropfenweise versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 800 rpm für 3 min (Megafuge 1.0 R, Heraeus) wurde das Medium abgenommen, das Zellpellet in 6 ml-Kulturmedium resuspendiert und in eine 10 cm-Kulturschale überführt.

2.4.2 Kultivieren von Zellen

Die Kultur von HEK 293T und Cos-7 Zellen erfolgte in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C. Zum Passagieren der adhärent wachsenden Zellen (Lindl und Bauer, 1989) wurden diese nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen, pro 10 cm-Kulturschale mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37 °C, 5 min) abgelöst und in einer geeigneten Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt. HEK 293T Zellen wurden in MEM + 10% FCS, Cos-7-Zellen in DMEM + 10% FCS kultiviert und alle 3 bis 4 Tage 1:9 passagiert.

Zur Kultivierung von primären Neuronen wurden zunächst Hippocampi von E18 Ratten freipräpariert und für 15 min in 5 ml Papain-Lsg. für Primärkulturen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Protease-Reaktion durch Zugabe von 10 ml DMEM + 10% FCS abgestoppt. Die Hippocampi wurden dreimal mit 10 ml DMEM + 10% FCS gewaschen. Im letzten Waschschrift wurde die gesamte Waschlösung abgenommen und die Hippocampi in 1 ml DMEM + 10% FCS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren mit Hilfe einer blauen Spitze tituiert. Nachdem keine Zellaggregate mehr sichtbar waren, wurden die Zellen mit DMEM + 10% FCS aufgefüllt, in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in einer Dichte von 45000-60000 Zellen/ ‚Well‘ in DMEM + 10% FCS ausgesät. Nach 2 h wurde das Medium abgesaugt und durch 600 µl Neurobasalmedium + 10% B27 und 3 mM AraC ausgetauscht. Alle sieben Tage wurden 200 µl des Mediums, das als konditioniertes Medium bezeichnet wird, durch frisches Neurobasalmedium ersetzt.

2.4.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung adhärenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37 °C) abgelöst, mit 2-3 ml Kulturmedium versetzt und in ein 15 ml-Kulturröhrchen überführt. Nach Pelletieren für 10 min bei 800 rpm und Raumtemperatur (Megafuge 1.0 R, Heraeus) wurde das Medium abgenommen und das Zellpellet in insgesamt 1 ml eisgekühltem Einfriermedium (Kulturmedium und Dimethylsulfoxid im Verhältnis 9:1 gemischt) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann in ein auf Eis gelagertes Kryoröhrchen überführt und über Nacht in einem Isopropanolbad langsam auf -70 °C gekühlt, bevor es in flüssigem Stickstoff überführt wurde.

2.4.4 Transfektion von Zellen

2.4.4.1 Calciumphosphat-vermittelte Transfektion

HEK 293T-Zellen

Zur transienten Expression rekombinanter Proteine wurden HEK 293T-Zellen mittels Calciumphosphat Kopräzipitation transfiziert. Für dieses Verfahren ist hochreine DNA erforderlich (2.2.1.3). 293T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion im Verhältnis 1:4 passagiert, so daß sie am Tag der Transfektion eine 75% Konfluenz erreichten. In einem sterilen Röhrchen wurden pro 10 cm-Kulturschalen 750 µl H₂O mit 12 µg Plasmid und 250 µl 1 M CaCl₂ vermischt. Nach Zugabe von 1 ml 2X BBS-Puffer wurde der Ansatz erneut durchgemischt, für mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 8 ml MEM + 10% FCS (37 °C) versetzt. Anschließend wurde das Medium einer Kulturschale abgesaugt und durch den Transfektionsansatz ersetzt. Die Zellen wurden danach für 5 h und 37°C bei 3% CO₂ inkubiert. Abschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und nach Waschen mit PBS durch frisches MEM + 10% FCS ersetzt. Die 293T Zellen wurden bis zur Analyse der Genexpression für 24-48 h kultiviert.

Hippocampale Neuronen

Für Kulturen primärer hippocampaler Neuronen wurden 6 X 10⁵ Zellen pro ,well' in 600 µl Primärmedium in 24-Well-Platten auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Glasplättchen ausge-

sät und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am dritten Tag in Kultur (3 *DIV*) wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurde in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen 8 µg DNA in 37,5 µl Wasser mit 12,5 µl 1 M CaCl₂ vermischt. Nach Zugabe von 50 µl 2 X BBS-Puffer wurde der Ansatz 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro ‚Well‘ 150 µl ‚konditioniertes‘ Primärmedium abgenommen und durch 25 µl Transfektionsansatz ersetzt. Die Zellen wurden danach für 1 h bei 37 °C und 3% CO₂ inkubiert. Das entnommene Medium wurde in sterilen Röhrchen bei 37 °C aufbewahrt. Abschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und nach Waschen mit DMEM-Medium + 10% FCS durch 150 µl konditioniertes und 450 µl frisches Medium mit 3 mM AraC ersetzt. Die primären hippocampalen Kulturen wurden bis zur Analyse für 1-21 Tage kultiviert.

2.4.4.2 Lipofektion mit FuGene6

Cos-7 Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:500 (v/v) in Kulturmedium in 24-Well-Platten auf Fibronectin-beschichtete Glasplättchen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurde in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen eine Gesamtmenge von 1,5 µg DNA vorgelegt, ein Gemisch aus 300 µl Medium und 0,8 mg/ml FuGene6 tropfenweise zugegeben. Nach 15 min Inkubation wurde dieses Gemisch auf drei ‚Wells‘ verteilt. Die Zellen wurden anschließend für etwa 48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.5 Indirekte Immunfluoreszenz

2.5.1 Immunologischer Nachweis rekombinanter Proteine in Cos-7 Zellen

Zur Analyse transfizierter Cos-7 Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und für 15 min mit Fixierungspuffer 1 bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschstufen mit PBS für 1-5 min wurden die Zellen für den Nachweis intrazellulärer Proteine mit 1 ml Permeabilisierungspuffer 1 für 3 min behandelt und erneut einmal mit PBS gewaschen. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden, wurden die Deckgläschen für 1 h mit 1 ml Blockreagenz 1 bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurden die Zellen zunächst für 90 min mit dem ersten Antikörper, und nach dreimaligem Waschen in PBS (je 5 min) schließlich für 1 h mit dem zweiten Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, in einer feuchte Kammer inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Zellen stets abgedunkelt gehalten, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Abschließend wur-

den die Deckgläschen viermal für 5 min mit PBS und einmal für 1 min mit H₂O gewaschen und dann mit ‚*Mounting Medium*‘ auf Objektträgern fixiert.

2.5.2 Immunologischer Nachweis rekombinanter und endogener Proteine in primären hippocampalen Neuronen

Primäre hippocampale Neuronen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 15 min bei RT mit Fixierungspuffer 2 inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS für 1-5 min wurden die Zellen für den Nachweis intrazellulärer Proteine mit 1 ml Permeabilisierungspuffer 2 für 3 min auf Eis inkubiert und erneut einmal mit PBS gewaschen. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden, wurden die Deckgläschen für 1 h bei Raumtemperatur mit 1 ml Blockreagenz 1 behandelt. Danach wurden die Zellen zunächst für 90 min für den Nachweis rekombinanter Proteine oder über Nacht für den Nachweis endogener Proteine mit dem ersten Antikörper in einer feuchten Kammer inkubiert und nach dreimaligem Waschen in PBS (je 5 min) schließlich für 1 h mit dem zweiten Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, in einer feuchten Kammer inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Zellen abgedunkelt gehalten, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Abschließend wurden die Deckgläschen viermal für 5 min mit PBS und einmal für 1 min mit H₂O gewaschen und dann mit ‚*Mounting Medium*‘ auf Objektträgern fixiert

2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteine auf histologischen Schnitten

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden ausschließlich Kryostat-Schnitte verwendet. Hierfür wurden Embryonen oder Gehirne von Mäusen durch Perfusion mit PLP-Puffer fixiert (siehe unten), freipräpariert und für weitere 2 h bei 4 °C nachfixiert. Anschließend wurden die Objekte in 30% Sucrose/PBS bei 4 °C in sterilen Röhrchen inkubiert. Nachdem das Gewebe mit der Lösung durchtränkt war, was sich durch Absinken zeigte, wurde das Objekt in *Tissue Tek* eingebettet und bei -20 °C eingefroren. Mit Hilfe des Kryotoms wurden 12-50 µm-Schnitte bei -20 °C bis -30 °C hergestellt, auf SuperFrost-Objektträger übertragen, 2 h bei RT getrocknet und bei -70 °C gelagert.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Schnitte aufgetaut und mit ‚*Pap-Pen*‘ umkreist, um das Überlaufen der Färbelösungen zu verhindern. Danach wurden die Objektträger 10 min in PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte für 1 h mit Blocklösung 2 benetzt. Die Antikörper wurden in der Blocklösung

verdünnt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C.

Nach dreimaligen Waschen für 5 min in PBS wurden die sekundären Antikörper in Blocklösung 2 verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte im Dunklen für 1 h. Vor dem Eindecken in Fluoreszenz ‚*Mounting Medium*‘ wurden die Schnitte dreimal für 5 min im Dunklen in PBS sowie eine 1 min in Aqua bidest. gewaschen.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
α -Flag M2	1 : 5 000	Ziege α -Maus Alexa Fluor 488 (grün) Ziege α -Maus Alexa Fluor 594 (rot),	1 : 1 000 1 : 1 000
α -Myc (Maus)	1 : 5 000	Ziege α -Maus Alexa Fluor 594	1 : 1 000
α -Myc (Kaninchen)	1 : 500	Ziege α -Kaninchen Alexa-Fluor 594	1 : 1 000
		Rhodamine-Phalloidin	1 : 200
α -Sema4B	1 : 2 000	Ziege α -Kaninchen Alexa-Fluor 488	1 : 1 000
α -PSD-95	1 : 100	Ziege α -Maus Alexa-Fluor 594	1 : 1 000
α -ProSAP-1	1 : 500	Ziege α -Meerschweinchen Alexa-Fluor 594	1 : 1 000
α -Bassoon	1 : 150	Ziege α -Maus Alexa-Fluor 594	1 : 1 000
α -NMDR-1	1 : 200	Ziege α -Maus Alexa-Fluor 594 Ziege α -Kaninchen Alexa-Fluor 594	1 : 1 000 1 : 1 000
α -Neuropilin-1	1 : 200	Ziege α -Kaninchen Alexa-Fluor 488	1 : 1 000
α -Neuropilin-2	1 : 200	Ziege α -Kaninchen Alexa-Fluor 488	1 : 1 000
α -Galaktosidase	1 : 50	Ziege α -Maus Alexa-Fluor 594	1 : 1000

Tabelle 8: Diese Tabelle fasst für alle endogenen und rekombinanten Proteine die optimale Anfärbetechnik zusammen. Die verwendeten Antikörper sind näher in Tabelle 5 aufgeführt.

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 *Whole Mount-Färbung von Embryonen*

E9,5, E10,5 oder E11,5 Embryonen wurden aus dem Uterus präpariert und der Dottersack zur Genotypisierung verwendet. Die Embryonen wurden einmal mit eiskaltem 1 X PBS gewaschen und mit Fixierungspuffer 1 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen dreimal in 1 X PBS gewaschen (5 min, Raumtemperatur), in einer aufsteigenden Methanolreihe dehydriert (25 %, 50 %, 75 %, 100%) und mit 5 % H₂O₂/ Methanol (5 h, RT) behandelt, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Nach zwei Waschschritten in 100 % Methanol wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert (75 %, 50 %, 25 %, 1 X PBS). Anschließend wurden die Embryonen dreimal in PBS-MT gewaschen (1 h, 4°C) und über Nacht bei 4 °C mit dem in PBS-MT verdünnten 1. Antikörper inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit PBS-MT (1 h, 4°C) wurden die Embryonen über Nacht bei 4 °C mit dem in PBS-MT verdünnten 2. Antikörper (HRP-gekoppelt) inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen erneut fünfmal in PBS-MT gewaschen. Um das Antigen zu detektieren, wurde die Embryonen zunächst 20 min bei RT in Färbelösung 1 inkubiert. Nach Überführen der Embryonen in Färbelösung 2 wurde die Farbreaktion unter dem Stereomikroskop verfolgt. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit PBT gestoppt und die Embryonen bei 4 °C gelagert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Nikon Digitalkamera.

2.6.2 *Histologischer Nachweis endogener Proteine auf Schnitten*

Zur Analyse der Expression von Neuropilin-1 im *Bulbus olfactorius* wurden Mäuse durch Perfusion in PLP-Puffer fixiert. Die Mäuse wurden dekaptiert, und die Köpfe für weitere 2 h bei 4 °C nachfixiert. Die Köpfe wurden enthäutet und in 30 % Sucrose/ 1 x PBS über Nacht bei 4 °C gelagert. Nachdem das Gewebe abgesunken war wurden Augen und Kieferknochen sowie störende Gewebe entfernt. Der caudale und der rostrale Bereich des Kopfes wurde bis zu einem Abstand von 1 mm zum *Bulbus olfactorius* mittels einer Rasierklinge entfernt. Anschließend wurde das Gewebe auf einem horizontalen *sledge* Mikrotom auf Trockeneis eingefroren. Es wurden 50 µm Schnitte angefertigt und in 1 X PBS überführt.

2.6.3 Whole Mount-lacZ-Färbung vom Bulbus olfactorius

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, dekaptiert, und das Gehirn freipräpariert. Das Gewebe wurde kurz in 1 X PBS gewaschen und für 30 min bei RT in Fixierungspuffer 2 inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal für 20 min bei RT mit 1 X PBS gewaschen. Der Nachweis der β -Galaktosidase durch eine Farbreaktion wurde durch die Zugabe der X-Gal-Färbelösung initiiert und über Nacht bei 30 °C durchgeführt. Nachdem eine blaue Färbung sichtbar war, wurde die Farbreaktion durch dreimaliges Waschen in 1 X PBS gestoppt. Die Gehirne wurden mit Hilfe eines Leica-Stereomikroskops analysiert und durch eine Nikon Digitalkamera dokumentiert.

2.7 Tierversuche

2.7.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem künstlichen Tag- und Nachtrhythmus bei kontrollierter Temperatur von $21 \pm 1^\circ\text{C}$ und 50-60 % relative Luftfeuchtigkeit. Jungtiere wurden 4 Wochen nach der Geburt von der Mutter getrennt.

2.7.2 Perfusion

Neugeborene oder 5 Tage alte Mäuse wurden auf Eis betäubt, der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt. Anschließend wurde die rechte Vorkammer mit einer Feinpinzette perforiert. 30 ml PLP-Fixierungspuffer wurden mit einer 50 ml Spritze mittels einer 22 1/2 Gauge Kanüle in das linke Ventrikel des Herzens injiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kanüle nicht durch das Septum gestoßen wurde. Nach kompletter Injektion des Fixierungspuffers wurde die Maus dekaptiert, Haut und äußere Gewebe entfernt, und das Gehirn für 2 h bei 4 °C nachfixiert.

2.7.3 Immunisierung von Kaninchen

SPF Kaninchen wurden nach dem folgenden Protokoll durch die Firma Eurogentec (Köln) durchgeführt. 1 ml Injektionslösung (0,5 ml Antigen in 1 X PBS und 0,5 ml Standard

Freud's Adjuvant) wurden intraperitoneal an Tag 0 (0,2 mg Antigen), 14, 21, 48, 70 (0,075 mg) injiziert. Blutentnahmen wurden an Tagen 0 (Präimmun-Serum, 2 ml), 35, 56 (Testblutung, 2 ml), 77 (1. Blutung, 2 X 20 ml) und 91 (2. Blutung, 50 ml) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Genetische Analyse des sekretierten Semaphorins Sema3A

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Rolle des sekretierten Semaphorins 3A näher charakterisiert werden. Dabei sollten im besonderen zwei unterschiedliche Systeme im Vordergrund stehen, das olfaktorische System und das Blutgefäßsystem, da der Rezeptor für Sema3A, Neuropilin-1, sowohl auf olfaktorischen sensorischen Neuronen des Riechepithels (Schwartz et al., 2000) als auch auf Endothelzellen exprimiert wird (Miao et al., Serini et al., Eingereicht). Die Funktion von Sema3A für die Entwicklung dieser unterschiedlichen Zelltypen sollte daher durch die Analyse des Phänotyps der Mutation von *Sema3a* genauer untersucht werden.

3.1.1 Rückkreuzung der *Sema3a* Mauslinie in den CD1 Hintergrund

Bisher wurden zwei unabhängige Mausmutanten des *Sema3a* Gens generiert (Tangiuchi et al., 1997, Behar et al., 1996). Die beiden Linien unterscheiden sich nicht nur in der Art der Mutation, sondern auch in ihrem genetischen Hintergrund. Der genetische Hintergrund hat einen starken Einfluß auf die phänotypische Ausprägung der Mutation (Taniguchi et al., 1997); so sterben *Sema3a*^{-/-} Mäuse im C57BL/6 Hintergrund spätestens einen Tag nach der Geburt. Um seine Rolle postnatal untersuchen zu können, wurde die *Sema3a* Mutation in den CD1 Hintergrund eingekreuzt (Taniguchi et al., 1997; freundlicherweise von Dr. Verhaagen zur Verfügung gestellt).

Nach Verpaarung von zwei für die *Sema3a* Mutation heterozygoten Weibchen mit CD1 Männchen zeigte die F1 Generation noch eine bei embryonaler oder perinataler Letalität zu erwartende Verteilung der Genotypen (64% WT, 36% heterozygot für die *Sema3a* Mutation). Ab der F3 Generation konnten jedoch bereits unter drei Wochen alten Tieren *Sema3a*^{-/-} Mäuse identifiziert werden. Allerdings waren nur 14% der F3 Tiere homozygot für die *Sema3a* Mutation (Abb. 8 A).

A Genotyp	Sema3a		
	+/+	+/-	-/-
F 1	24 (64 %)	14 (36 %)	-
F 3	18 (28 %)	37 (58 %)	9 (14 %)
F 5	27 (27 %)	67 (64 %)	10 (9 %)
> F 5	49 (23 %)	134(65%)	24 (12 %)

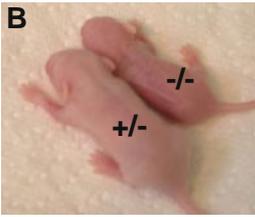


Abb. 8: *Sema3a* Mutanten zeigen eine verringerte Letalität nach Einkreuzen in den CD1 Hintergrund. (A) Im ursprünglichen genetischen Hintergrund der *Sema3A* Mauslinie kam es zu perinataler Letalität von *Sema3a*^{-/-} Mäusen. Aus diesem Grund wurden männliche Mäuse, heterozygot für die *Sema3a* Mutation, mit CD1 WT Weibchen verpaart, die Nachkommen 4 Wochen nach der Geburt von den Müttern getrennt und genotypisiert. Schon nach der 3. Rückkreuzung konnten überlebende *Sema3a*^{-/-} Mäuse identifiziert werden. Allerdings waren die homozygoten Mutanten selbst nach der 10. Generation unterrepräsentiert. (B) *Sema3a* Knockout-Mäuse sind im Vergleich zu ihren heterozygoten Geschwistern kleiner und steril.

Sema3a^{-/-} Mäuse waren wesentlich kleiner als ihre heterozygoten und WT Geschwister (Abb. 8 B). Verpaarungsversuche homozygoter Nachkommen zeigten, daß *Sema3a*^{-/-} Mäuse steril sind. Dies war durchgehend auch in späteren Generationen zu beobachten. *Sema3a*^{-/-} Mäusen verhielten sich in einfachen Koordinationstests (Ausrichten der Beine nach Hochheben am Schwanz) und akustischen Reizen (Klatschen) normal und reagierten wie ihre heterozygoten Geschwister. Auch in der F6 und späteren Generationen waren *Sema3a*^{-/-} Tiere mit einem Anteil von 12% unterrepräsentiert.

Erst nach der 20. Generation kann eine Mauslinie als in allen bis auf den selektiv mutierten Loci homozygot betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde ab der F2 Generation Linien für die *Sema3a* Mutation heterozygoter Tiere zum Erhalt mit CD1 WT-Tieren verpaart. Um homozygote Mutanten für die phänotypische Analyse zu erhalten, wurden aus dieser Zucht heterozygote *Sema3a* Mäuse untereinander verpaart.

3.1.2 Neuropilin-1⁺ Axone sind in *Sema3a* Mutanten fehlgeleitet

Der Rezeptor von Sema3A, Neuropilin-1 (Nrp-1), wird in einer Subpopulation von sensorischen Neuronen in den Zonen 1 und 2 des Riechepithels exprimiert (Schwarting et al., 2000). Nrp-1⁺ Fasern terminieren in neugeborenen Mäusen in der lateralen Hälfte des rostralen *Bulbus olfactorius* (BO) bzw. einer medialen Region im caudalen BO (Schwarting et al., 2000). *Nrp-1* und *Sema3a* mRNA werden im BO in zueinander komplementären Regionen exprimiert und zeigen keine Überlappung (Abb. 9 B). In neugeborenen Mäusen ist Neuropilin-1 im rostralen BO in einer lateralen Region exprimiert, im caudalen BO jedoch medial.

Um zu überprüfen, ob die Verteilung der Nrp-1⁺ Fasern zu einem späteren Zeitpunkt der

Entwicklung unverändert ist, wurden zunächst 50 μm Schnitte von WT-Mäusen am Tag P5 mit $\alpha\text{-Nrp-1}$ Antikörper gefärbt. Es zeigte sich, daß Nrp-1⁺ Axone die gleich räumliche Verteilung wie in neugeborenen Mäusen aufwiesen (Abb. 9 B).

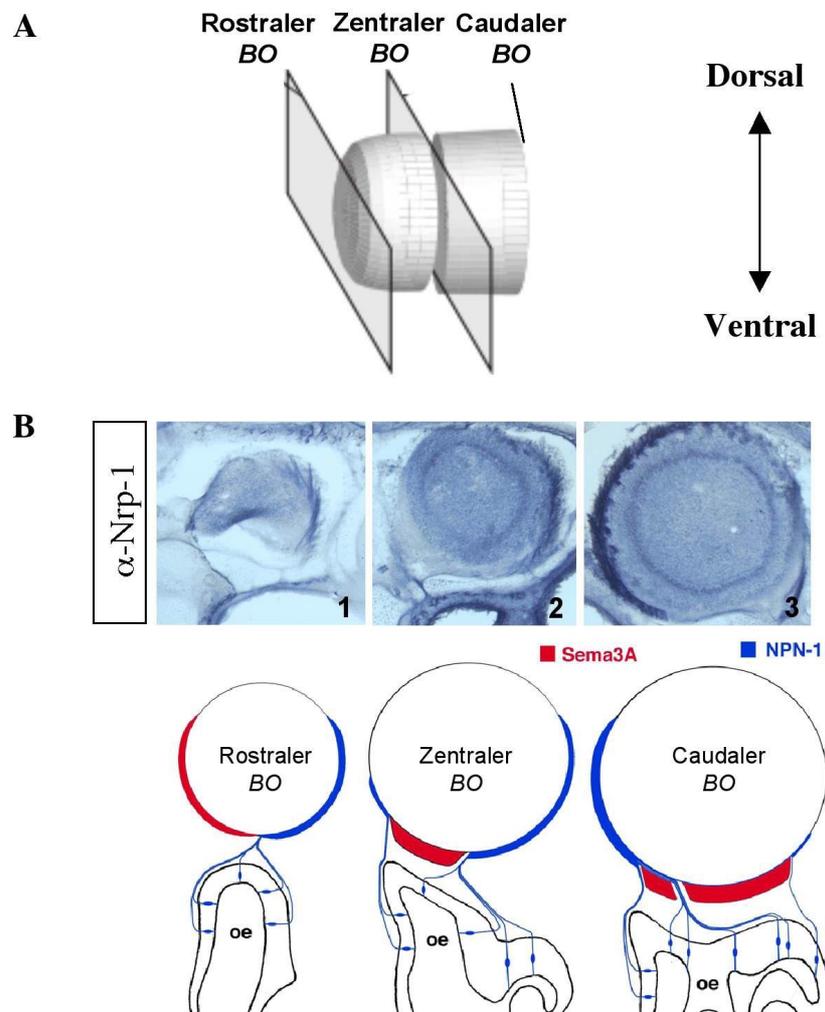


Abb. 9: Neuropilin-1 Expression im olfaktorischen System. (A, B) 50 μm Schnitte des BO von WT-Mäusen wurden mit einem $\alpha\text{-Nrp-1}$ Antikörper gefärbt und mit Hilfe des Dako DAB-Kits visualisiert. Die Position der Nrp-1⁺ Fasern wechselt von der lateralen zur medialen Region in Schnitten von rostral (1) über zentral (2) nach caudal (3). Die Nrp-1 Expression ist demnach komplementär zur Verteilung der *Sema3a* mRNA im BO. *Sema3A* führt daher wahrscheinlich Nrp-1⁺ Axone vom Riechepithel durch die ventrale Nervenschicht in den Riechkolben. 1. AK: Kaninchen $\alpha\text{-Nrp-1}$; 2. AK: Ziege $\alpha\text{-Kaninchen-HRP}$; BO = *Bulbus olfactorius*, oe = olfaktorisches Epithel; dorsal ist oben, ventral ist unten, medial links, lateral rechts. (Schematische Abbildung modifiziert nach Schwarting et al., 2000).

Bisher wurde eine Fehlleitung von Nrp-1⁺ Axonen nur in neugeborenen *Sema3a* Mutanten (Schwarting et al., 2000), nicht jedoch postnatal untersucht. Es blieb unklar, ob fehlgeleitet Nrp-1⁺ Axone zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung ihre Zielglomeruli finden oder eliminiert werden. Die Einkreuzung der *Sema3a* Mutation in den CD1 Hintergrund erlaubte es nun auch postnatale Stadien zu analysieren.

50 μm -Schnitte von homo- und heterozygoten *Sema3a* Mutanten desselben Wurfes wurden mit α -Nrp-1 Antikörper angefärbt (Abb. 10). In homozygoten *Sema3a* Mutanten zeigte sich eine Fehlleitung von Nrp-1⁺ Fasern im caudalen BO (Abb. 10 B). Die Axone waren im Vergleich zu heterozygoten *Sema3a* Mäusen (Abb. 10 A) nicht auf die laterale Region beschränkt, sondern verteilten sich über die gesamte ventrale Nervenschicht des BO. Zusätzlich war im ventralen Bereich eine deutliche Defaszikulierung der Axone erkennbar (Abb. 10 C,D). Neben der Fehlleitung von Nrp-1⁺ Fasern waren auch ektopische Nrp-1⁺

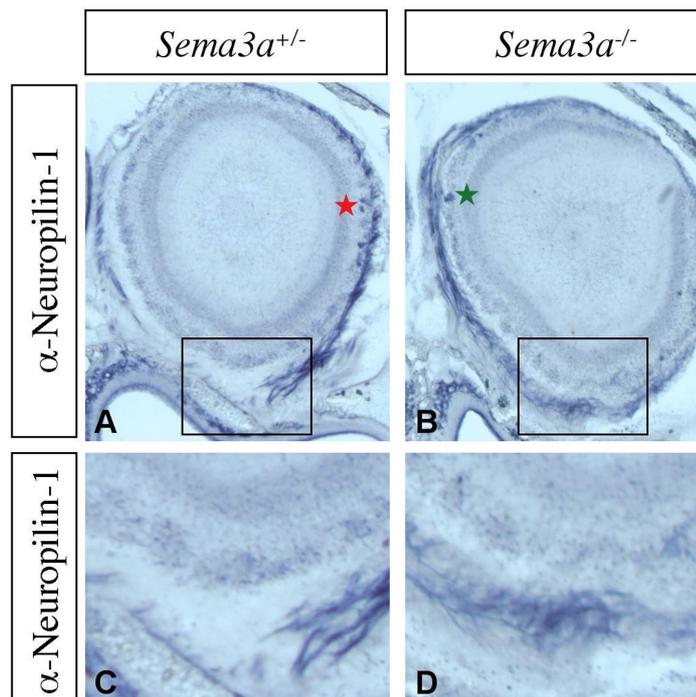


Abb. 10: Nrp-1⁺ Axone sind in *Sema3a* Mutanten fehlgeleitet. 50 μm Schnitte von P5 Mäusen, die heterozygot (+/-) bzw. homozygot (-/-) für die *Sema3a* Mutation waren, wurden wie beschrieben mit einem α -Nrp-1 Antikörper gefärbt. In *Sema3a*^{-/-} Mäusen sind Nrp-1⁺ Axone nicht nur auf die laterale Region des BO eingeschränkt, sondern verteilen sich über den gesamten BO (A, B). Die Vergrößerung der in A und B markierten Bereiche zeigt die Verteilung von Nrp-1⁺ Axonen in der lateralen Nervenschicht von *Sema3a*^{+/-} Mäusen (C) und *Sema3a*^{-/-} Mäusen (D). Im Gegensatz zu heterozygoten *Sema3a*-Mäusen (roter Stern), sind Nrp-1⁺ Glomeruli in *Sema3a* Mutanten in der medialen Region des BOs sichtbar (grüner Stern). 1. AK.: Kaninchen α -Nrp-1; 2. AK.: Ziege α -Kaninchen-HRP, dorsal ist oben, lateral links, medial rechts, ventral unten.

Glomeruli nachweisbar. In heterozygoten *Sema3a* Mäusen waren Glomeruli in der lateralen Hälfte des BOs zu erkennen (Abb. 10 A, roter Stern). In *Sema3a* Mutanten konnten Glomeruli dagegen auch in der medialen Region beobachtet werden (Abb. 10 B; grüner Stern). Die Fehlleitung von Nrp-1⁺ Axonen ist daher auch mit einer veränderten Position der von diesen innervierten Glomeruli im BO verbunden. Die Ergebnisse zeigen, daß die Fehlpositionierung von Nrp-1⁺ Axonen am Tag P5 noch besteht und demnach nicht korrigiert wurde.

3.1.3 Analyse der Projektion von OR37A⁺ olfaktorischen Neuronen in *Sema3a* Mutanten

Nrp-1 markiert eine große Subpopulation von Axonen, die zahlreiche Glomeruli innervieren. Um die Navigation olfaktorischer Axone, die durch Expression eines OR charakterisiert sind, nachvollziehen zu können, wurde ein transgener Marker verwendet. Hierzu wurde eine Mauslinie genutzt, in der die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein taulacZ (Mombaerts et al., 1996), bestehend aus dem Mikrotubuli-bindenden Protein Tau und dem *E.coli* Enzym β -Galaktosidase, durch homologe Rekombination in das *OR37a* Gen eingeführt wurde. Die Verwendung eines IRES (*internal ribosomal entry site*) ermöglichte die unabhängige Translation des taulacZ-Fusionsproteins (Abb. 11 A).

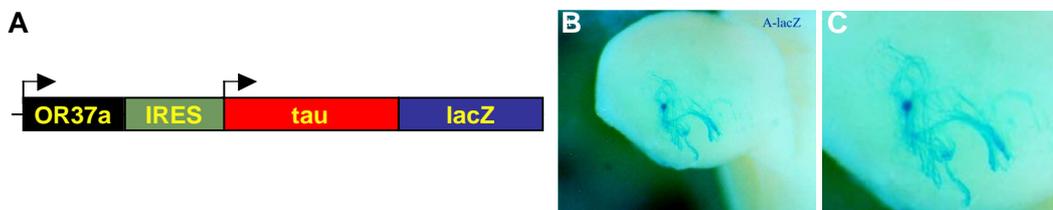


Abb. 11: Analyse der Navigation olfaktorischer Axone mit Hilfe transgener Marker. (A) Die Struktur der $Or37a^{taulacZ}$ Loci ist schematisch dargestellt. Das Fusionsprotein taulacZ, bestehend aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau und dem Markerprotein lacZ wurde durch homologe Rekombination in das *Or37a* Gen eingeführt, die für unterschiedliche olfaktorische Rezeptoren kodieren (Mombaerts, 2000). Die Verwendung eines IRES (*internal ribosomal entry site*) ermöglicht die unabhängige Translation des taulacZ-Fusionsprotein (modifiziert nach Strotmann et al., 2000). (Größe der Kassetten ist nicht maßstabsgetreu). (B,C) Die Ansicht auf die ventrale Seite des rechten Bulbus olfactorius nach Entfernen aus der Nasenhöhle zeigt, daß $Or37a^{taulacZ}$ positive Axone auf einen Glomerulus im Bulbus olfactorius konvergieren. In der Vergrößerung ist der Glomerulus mit den konvergierenden Axonen zu erkennen (C). LacZ wurde durch eine Inkubation des fixierten Gewebes mit dem Substrat X-Gal visualisiert (modifiziert nach Strotmann et al., 2000).

Mit dieser transgenen Mauslinie können Neuronen, die OR37A exprimieren, durch eine X-Gal Färbung visualisiert werden. OR37A⁺ Axone konvergieren auf 1-2 Glomeruli pro BO (Strotmann et al. 2000; Abb. 11 B,C). Für diese Analyse wurden *Sema3a* Mäuse verwendet, die homozygot für das Transgen *Or37a^{taulacZ}* waren. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß Unterschiede in der Stärke der Expression des *taulacZ* Markergens die Analyse des Phänotyps beeinflusst. Das Gehirn neugeborener *Sema3a/Or37ataulacZ^{+/+}* Mäuse wurde inklusive BO präpariert und durch den Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität die Projektion von OR37A⁺ Neuronen sichtbar gemacht.

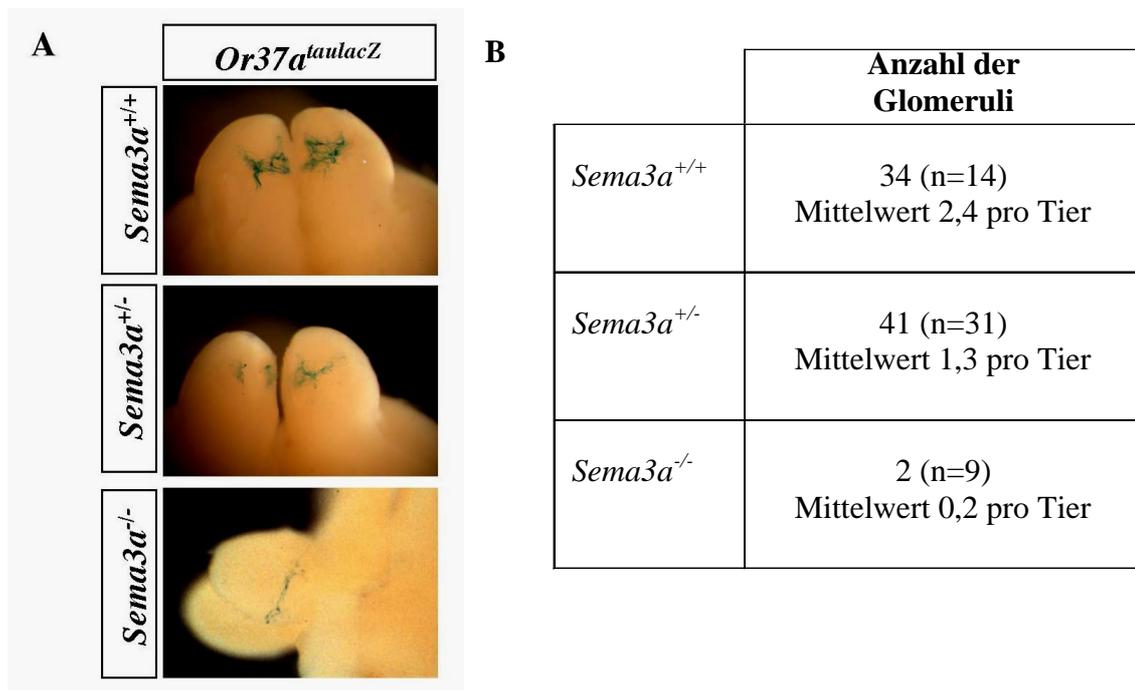


Abb. 12: OR37A⁺ Axone zeigen Projektionsdefekte in *Sema3a^{-/-}* Mäusen (A) OR37A⁺ Neurone von neugeborenen Mäusen, die homozygot für das *Or37a^{taulacZ}* Transgen, und entweder heterozygot (+/-) oder homozygot (-/-) für die *Sema3a* Mutation waren, wurden durch Inkubation mit dem X-Gal Substrat visualisiert. In der *Sema3a^{-/-}* Mutante waren OR37A⁺ Axone nicht in der Lage, auf ihre normale Zielglomeruli zu konvergieren. (B) Der Vergleich von WT, heterozygoten und homozygoten *Sema3a* Tieren zeigte einen Dosis-abhängigen Effekt von Sema3A auf die Navigation von OR37A⁺ Axonen. Im Vergleich zu WT-Mäusen (*Sema3a^{+/+}*) sind in *Sema3a^{+/-}* Mäusen im Durchschnitt weniger Glomeruli zu erkennen. In *Sema3a^{-/-}* Mäusen konnten nur bei einem Fall auf beiden BO je ein Glomerulus beobachtet werden. Dieser war jedoch im Vergleich zum WT kleiner.

In *Sema3a^{+/+}* Mäusen konnte ein feines Netzwerk an β -Gal⁺ Axonen beobachtet werden, die im Durchschnitt auf 2-3 Glomeruli pro BO konvergierten (Abb. 12 B). Dies weicht von den Daten von Strotmann et al. (2000) ab, in denen jeweils nur 1-2 Glomeruli pro BO zu erkennen sind. Der Vergleich der Projektion in *Sema3a^{+/+}* und *Sema3a^{-/-}* Tieren zeigte ausgeprägte Defekte in *Sema3a* Mutanten. Es war in 8 von 9 untersuchten Glomeruli keine Konvergenz von OR37A⁺ Neuronen nachzuweisen (Abb. 12 A). Außerdem war eine starke Verringerung der Zahl β -Gal⁺ Axone in *Sema3a* defizienten Mäusen sichtbar. Auch *Sema3a^{+/-}* Mäuse zeigten subtile Defekte. Die OR37A⁺ Axone konvergierten auf weniger Glomeruli pro

BO im Vergleich zu WT-Tieren (Abb. 12). Dies läßt auf einen Gen-Dosis-abhängigen Effekt von *Sema3A* schließen. Diese Daten zeigen, daß *Sema3A* für die Navigation und/oder die Konvergenz von *OR37A*⁺ Axonen notwendig ist.

3.1.4 Vaskuläre Defekte in *Sema3a* Mutanten

Die Liganden-bindende Untereinheit des *Sema3A* Rezeptors, Neuropilin-1, wird nicht nur in neuronalen Zellen, sondern auch auf Endothelzellen exprimiert (Soker et al., 1998; Gluzman-Poltorak et al., 2000). *Nrp-1* kann selber *VEGF*₁₆₅ binden und hat als Ko-Rezeptor für *VEGFR-1* eine wichtige Funktion für die Entwicklung des Blutgefäßsystems (Yancopoulos et al., 1999).

Um die Rolle von *Sema3A* in der Vaskulogenese und Angiogenese *in vivo* näher zu untersuchen, wurde das vaskuläre System von *Sema3a*^{-/-} Embryonen zwischen E9,5 und E11,5 untersucht, da in diesem Zeitrahmen essentielle Prozesse der Blutgefäßentwicklung stattfinden. Viele Mutationen, die die Entwicklung des Herzens und der Blutgefäße beeinflussen, führen zu diesem Zeitpunkt zu embryonaler Letalität (Gale und Yancopoulos, 1999). Zwischen E9,5 und E11,5 entwickelt sich aus dem primären vaskulären Plexus durch einen Prozeß der Angiogenese das Blutgefäßsystem (Theiler, 1989). Die Blutgefäße von *Sema3a* Mutanten wurden immunhistochemisch durch Färbung mit einem α -PECAM-1 Antikörper (*platelet endothelial cell adhesion molecule*), der spezifisch vaskuläre Endothelzellen erkennt, untersucht (Baldwin et al., 1994; Adams et al., 1999).

Insgesamt wurden 8 homozygote *Sema3a*^{-/-} Embryonen am Tag E9,5 analysiert. Davon zeigten 7 Embryonen starke vaskuläre Defekte in der Kopfregion (87%), und 6 Embryonen eine abnormale Blutgefäßbildung in den Kiemenbögen. In heterozygoten *Sema3a* Embryonen war ein hierarchisch organisiertes Blutgefäßsystem erkennbar mit Gefäßen, die von der vorderen Hauptvene des Kopfes auswachsen (Abb. 13 A, weiße Pfeile). *Sema3a*^{-/-} Embryonen zeigten dagegen keine Umbildung des primären Plexus (Abb. 13 B). In E9, 5 *Sema3a*^{+/-} Embryonen war in der Rumpfregeion die dorsale Aorta (Abb. 13 C, schwarze Pfeile) und vordere Hauptvene (Abb. 13 C, weiße Pfeile) gut erkennbar. In *Sema3a*^{-/-} Embryonen erschien die dorsale Aorta normal (Abb. 13 D, schwarze Pfeile), während die vorderen Hauptvenen des Rumpfes nicht zu erkennen waren (Abb. 13 D). Die intersomitischen Blutgefäße der Schwanzregion bilden ein feinstrukturiertes Netzwerk in den Somiten. In *Sema3a*^{-/-} Embryonen war dieses feine Netzwerk nicht zu erkennen (Abb. 13 E).

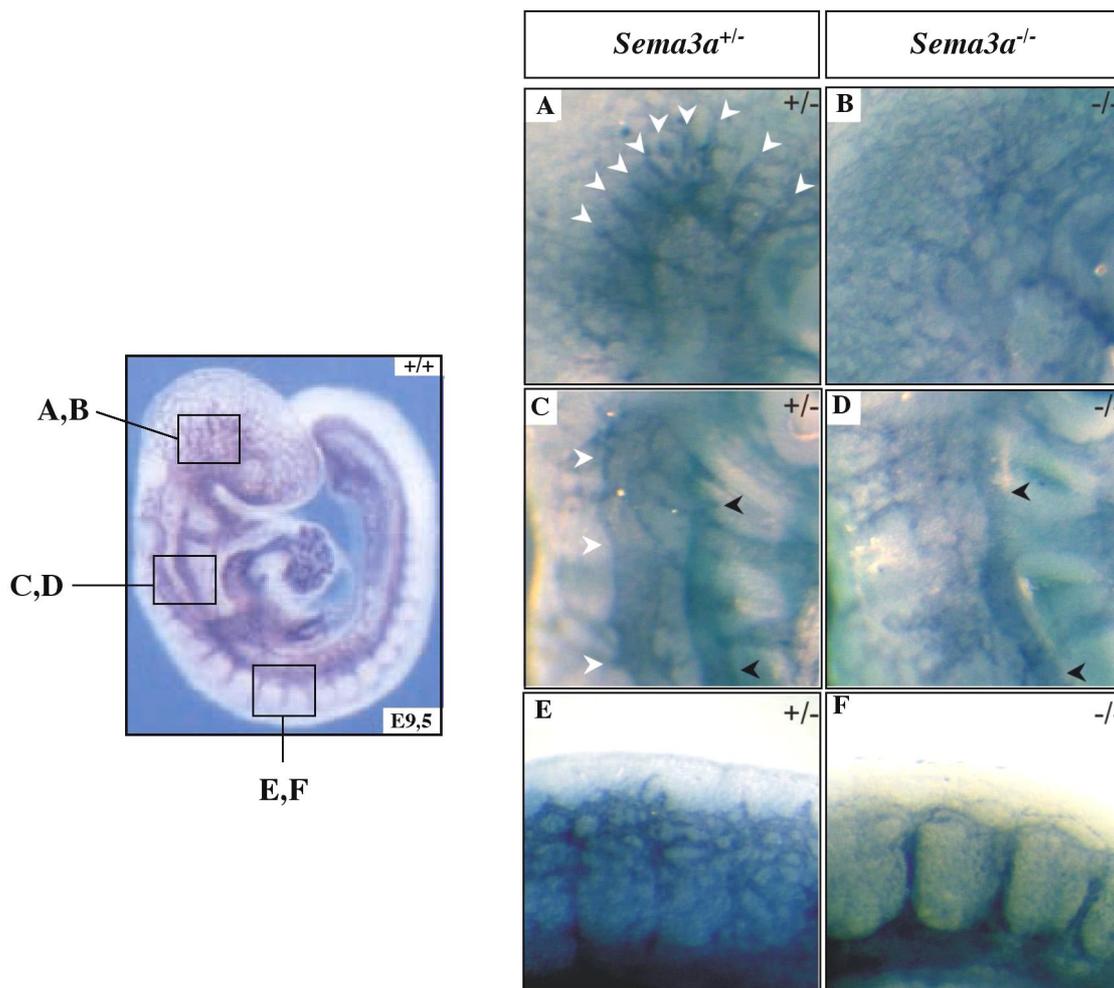


Abb. 13: Vaskuläre Defekte in E9,5 *Sema3a*^{-/-} Embryonen. (A-F) Ganze E9,5 Embryonen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit einem α -PECAM-1 Antikörper immunhistochemisch gefärbt, der das embryonale vaskuläre System sichtbar macht (A, B; rostral ist oben, dorsal ist links). **Kopfregion.** Die Verzweigungen der vorderen Hauptvene konnten in *Sema3a*^{+/-} Mäusen (A, weißer Pfeil) nachgewiesen werden, in denen der primäre Plexus zu erkennen ist, jedoch nicht in *Sema3a*^{-/-} Mäusen (B). (C,D) **Kiemenbögen** (rostral ist oben, dorsal ist links). Sowohl in *Sema3a*^{+/-} als auch in *Sema3a*^{-/-} Embryonen war die dorsale Aorta zu erkennen (schwarze Pfeile). In *Sema3a*^{-/-} Embryonen war die vordere Hauptvene nicht zu erkennen (D), während sie in heterozygoten Embryonen normal war (C, weiße Pfeile). (E,F) **Intersomitische Blutgefäße der Schwanzregion** (dorsal ist oben). Das fein strukturierte Netzwerk der Blutgefäße, das während des Prozesses der Umstrukturierung (*Remodelling*) der intersomitischen Blutgefäße in der dorsalen Seite entsteht, war im Gegensatz zu heterozygoten Embryonen (E) in *Sema3a*^{-/-} Embryonen nicht vorhanden (F). 1. AK.: Ratte α -PECAM-1; 2. AK: Ziege α -Ratte-HRP.

Auch in späteren embryonalen Stadien waren starke Unterschiede zwischen heterozygoten und homozygoten *Sema3a* Mutanten zu erkennen, die jedoch auf die Kopfregion beschränkt waren. Nach einer α -PECAM-1 Färbung zeigten E10,5 *Sema3a*^{-/-} Embryonen eine verringerte Komplexität des Netzwerkes der Hauptvenen in der Kopfregion. Anstelle des hierarchisch aufgebauten, verzweigten Blutgefäßsystems in *Sema3a*^{+/-} Embryonen war in vier von fünf homozygoten *Sema3a* Mutanten (87%) an E10,5 nur eine einzelne dominante Hauptvene zu erkennen (Abb. 14 A). Nach Auswertung der Kiemenbogen-Region und intersomitischen Blutgefäße konnten zwischen hetero- und homozygoten Embryonen jedoch keine

Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

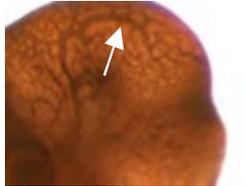
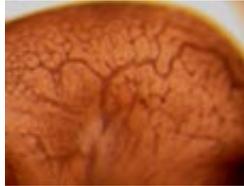
A	<i>Sema3a</i> ^{+/-}	<i>Sema3a</i> ^{-/-}	B	<i>Sema3a</i> ^{+/-}	<i>Sema3a</i> ^{-/-}	
	E 10,5				Verringerte Komplexität	
			Keine Hauptvene	na (n=10)	na (n=5)	
E 11,5			Verringerte Komplexität	16% (n=6)	100% (n=4)	E 11,5
			Keine Hauptvene	na (n=6)	25% (n=4)	

Abb. 14: Vaskuläre Defekte in E10,5 und E11,5 *Sema3a*^{-/-} Embryonen. (A) Ganze E10,5 und E11,5 Embryonen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit einem α -PECAM-1 Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Während in *Sema3a*^{+/-} Embryonen das Netz von Gefäßen hierarchisch organisiert war, war in *Sema3a*^{-/-} Embryonen eine dominante Hauptvene nachweisbar. Außerdem war bei mutanten E10,5 und E11,5 Embryonen eine verringerte Komplexität zu erkennen. In *Sema3a*^{-/-} Embryon fehlte in einem Fall die hintere Hauptvene. Die Ergebnisse sind tabellarische in (B) zusammengefasst. 1. AK.: Ratte α -PECAM-1; 2. AK: Ziege α -Ratte-HRP.

Auch an E11,5 zeigten homozygote *Sema3a*^{-/-} Mutanten eine im Vergleich zu *Sema3a*^{+/-} Embryonen verringerte Komplexität der cranialen Blutgefäße (Abb. 14 A, rechte Spalte). Außerdem fehlte bei einem von vier E11,5 *Sema3a*^{-/-} Embryonen die Hauptvene an der dorsalen Seite der Kopfregion (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigten 87 % der Mutanten eine verringerte Komplexität der cranialen Blutgefäße an E10,5, und E11,5 sogar zu 100%. In heterozygoten *Sema3a* Tieren war nur in 8% (E10,5) bzw. in 16% (E11,5) der untersuchten Tiere eine verringerte Komplexität festzustellen (Abb. 14 B).

Die starken Defekte in *Sema3a*^{-/-} Embryonen in frühen embryonalen Stadien zeigen, daß *Sema3A* eine wichtige Funktion für die Entwicklung des Blutgefäßsystems hat. Insbesondere die Umstrukturierung des primären Plexus der Blutgefäße (Angiogenese) ist massiv gestört. Erstaunlich ist jedoch, daß diese Effekte zu späteren Zeitpunkten in den Kiemenbögen und der Rumpfregeion nicht mehr so dominant erkennbar sind wie an E9,5. Demnach scheint es zu einer Korrektur der Defekte in späteren Stadien zu kommen.

3.2 Biochemische und funktionelle Analyse der Semaphorine der Klasse 4

Während die Funktion der sekretierten Semaphorine der Klasse 3 durch die Analyse von Mausmutanten gut charakterisiert ist, ist über die Semaphorine der Klasse 4 bisher noch nicht viel bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit durch biochemische und zellbiologische Ansätze eine funktionelle Analyse der Klasse 4 Semaphorine durchgeführt werden. Sequenzanalysen der zytoplasmatischen Domäne zeigten, daß 5 von 7 Klasse 4 Semaphorinen ein PDZ-Bindemotiv des Typs 1 enthalten (Abb. 15 A). PDZ-Domänen werden aufgrund der von ihnen erkannten Konsensus-Sequenzen in drei Klassen unterteilt (Abb. 15 B). Es stellte sich die Frage, ob die Semaphorine der Klasse 4, wie aufgrund ihrer Sequenz vorausgesagt, direkt mit PDZ-Domänen Proteinen interagieren können, und ob dies für die Funktion der Semaphorine wichtig ist. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, galt es, die Interaktion näher zu untersuchen.

A

Sema4A	-HLGAEVA
Sema4B	-DSVSVV
Sema4C	-NPEESSV
Sema4D	-DSDADGD
Sema4E	-IDDESEI
Sema4F	-TCDETSI
Sema4G	-QLDESSV

B

PDZ-Bindemotiv
Typ I X-S/T-X-V/L
Typ II X-F/Y-X-V/I
Typ III X-D-X-V

Abb. 15: PDZ-Bindemotive in Semaphorinen der Klasse 4. (A) Es sind die letzten 7 Aminosäuren des C-Terminus der Klasse 4 Semaphorine dargestellt. Sema4B, 4C, 4E, 4F und 4G enthalten ein PDZ-Bindemotiv des Typs 1 (B). (B) Die für die drei Typen von PDZ-Bindemotiven entscheidenden Konsensus-Sequenzen sind dargestellt (Sheng und Salas, 2001) Das PDZ-Bindemotiv des Typs 1 wird von Proteinen wie PSD-95 und GIPC erkannt. Die PDZ-Domänen Proteine Shank/ProSAP erkennen Typ 2, und mNOS den PDZ-Bindemotive-Typ 3.

3.2.1 Biochemischer Nachweis der Interaktion von Klasse 4 Semaphorinen mit PDZ-Domänen Proteinen

Zur Analyse der Interaktion von PDZ-Domänen Proteinen und Klasse 4 Semaphorinen wurden zunächst jeweils die Proteine SAP102, SAP97, GIPC1, PTP-BL, S-Scam und PSD-95 mit unterschiedlichen Semaphorinen in HEK 293T-Zellen koexprimiert und durch Immunpräzipitation und Western Blot auf ihre Interaktion getestet. Die Expressionsvektoren für die Klasse 4 Semaphorine enthalten ein N-terminales Flag- oder VSV-Epitop (Püschel et al., 1995, Püschel, unpubliziert). Es stellte sich allerdings heraus, daß die Expression der mit

VSV-markierten Proteine in HEK 293T-Zellen schwächer war (Fiore, Hovatta, persönliche Kommunikation). Die PDZ-Domänen Proteinen waren mit einem N-terminalen myc-Epitop oder EGFP markiert (Püschel, unpubliziert; Roth, unpubliziert; Garner et al., 2000; Boeckers et al., 1999). Dabei konnte eine Interaktion von Sema4B, Sema4C und Sema4G mit PSD-95 und mit GIPC1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden auch von Wang et al. (1999) für Sema4C und GIPC1 bestätigt. Ferner konnte ein Fragment mit den PDZ-Domänen 4 und 5 der Phosphatase PTP-BL und S-Scam Sema4C binden. Außerdem wurde eine Bindung von Sema4F und SAP97 nachgewiesen werden. SAP97 gehört wie PSD-95 zu der Familie der MAGUKs (*membrane-associated guanylate kinases*) und ist an Synapsen im Nervensystem nachweisbar (Craven und Bretz, 1998). Von dieser Vielzahl von Interaktion wurde eine für weitere Analysen ausgewählt. Wie in Kapitel 1.6, beschrieben ist PSD-95 eine essentielle Komponente für die Organisation der postsynaptischen Dichte (PSD) und organisiert die Moleküle, die an der PSD verankert sind. Für PSD-95 sind mehrere poly- und monoklonale Antikörper vorhanden, die eine detaillierte Analyse von PSD-95 in biochemischen und zellbiologischen Ansätzen zulassen.

Über die Funktion von Sema4B, 4C und 4F ist bisher noch nicht viel bekannt. Neben nicht-neuronalen Geweben sind sie vor allen Dingen in verschiedenen Regionen des ZNS exprimiert (Püschel, 1995) und könnten daher eine Rolle in der axonalen Wegfindung spielen. Die Interaktion mit einem Protein wie PSD-95 könnte jedoch auf eine weitere, neuartige Funktion von Klasse 4 Semaphorinen bei der Synaptogenese hindeuten. Daher wurde im folgenden die Interaktion von PSD-95 mit Klasse 4 Semaphorinen näher untersucht. PSD-95 wurde mit unterschiedlichen Semaphorinen der Klasse 4 in HEK 293T-Zellen exprimiert, die Zellen zwei Tage nach der Transfektion lysiert und anschließend durch Immunpräzipitation mit einem α -Flag Antikörper auf eine mögliche Interaktion untersucht (Abb. 16).

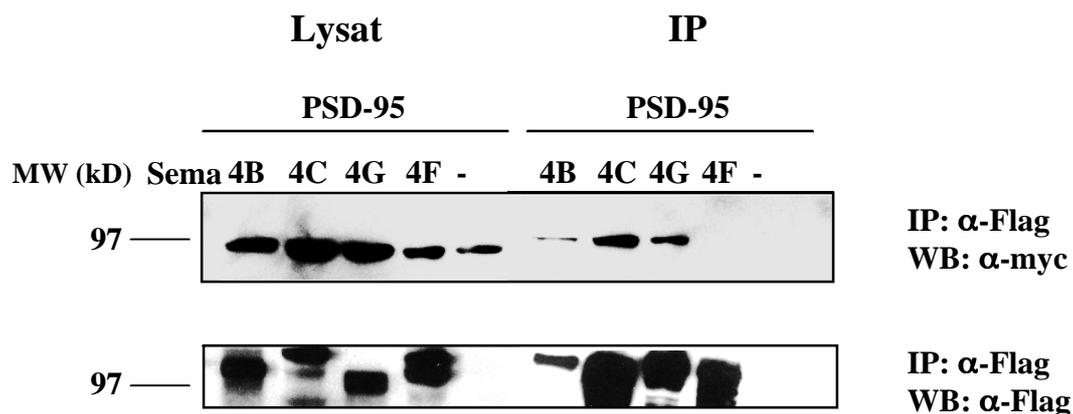


Abb. 16: Sema4B, 4C und 4G interagieren mit PSD-95. pBK-Flag-Sema4B (4B), pBK-Flag-Sema4C (4C), pBK-Flag-Sema4G (4G) und pBK-Flag-Sema4F (4F) wurden zusammen mit pGWI-myc-PSD-95 in HEK 293T-Zellen exprimiert (n= 8). Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Vektor pBK-CMV (-) transfiziert. Die Zellen wurde 48 h nach der Transfektion geerntet, lysiert, und eine Immunpräzipitation (IP) mit einem α -Flag Antikörper durchgeführt. Lysate und Immunpräzipitate wurden mittels Western Blot (WB) unter Verwendung von α -Flag und α -myc Antikörpern und anschließender Chemolumineszenz-Reaktion analysiert. Semaphorine haben eine Größe zwischen 95-99 kD, PSD-95 hat ein Molekulargewicht von 95 kD. 1. AK.: Maus α -Flag, Maus α -myc; 2. AK.: Kaninchen α -Maus-HRP.

Es konnte gezeigt werden, daß wie erwartet PSD-95 mit Sema4B, Sema4C und Sema4G interagiert. Dabei schien das Signal in der Immunpräzipitation von PSD-95 und Sema4B schwächer zu sein, allerdings war die Expression von Sema4B im Vergleich mit den anderen Semaphorinen der Klasse 4 auch geringer. Erstaunlicherweise konnte reproduzierbar die von Schutze et al.(2001) beschriebene Bindung von Sema4F an PSD-95 nicht bestätigt werden.

Die biochemischen Nachweise zur Interaktion von Klasse 4 Semaphorinen mit PDZ-Domänen Proteine sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

	Sema4B	Sema4C	Sema4G	Sema4E	Sema4F
PSD-95	+	+	+	-	-
SAP 102	-	-	-	-	-
SAP 97	-	-	-	-	+
GIPC1	+	+	+	-	-
PTP-BL (2+3)	-	-	-	nd	nd
PTP-BL(4+5)	-	+	-	-	-
S-Scam	-	+	nd	nd	nd

Tabelle 9: Tabellarische Zusammenstellung der Interaktionen von Klasse 4 Semaphorinen mit PDZ-Domänen Proteinen. Die aufgeführten Semaphorine und PDZ-Domänen Proteine wurden heterolog in HEK 293T-Zellen exprimiert und durch Immunpräzipitation auf ihre Interaktion getestet ($n \geq 3$). Es konnte gezeigt werden, daß das PDZ-Domänen Protein GIPC1 drei der Klasse 4 Semaphorine bindet. Die PDZ-Domänen 4 und 5 der Phosphatase PTP-BL und S-Scam interagieren mit Sema4C. PSD-95 interagiert mit drei der fünf getesteten Semaphorine. Ferner konnte eine Interaktion von SAP97 mit Sema4F nachgewiesen werden. nd = nicht durchgeführt.

3.2.2 PSD-95 induziert die Clusterbildung von Sema4B, Sema4C und Sema4G in Cos-7 Zellen

PSD-95 induziert die Clusterbildung von koexprimierten Proteinen wie NR-1 in Cos-7 Zellen (Kim et al., 1998; Hsueh et al., 1997). Es stellte sich nun die Frage, ob dies auch für die Semaphorine gilt. (Kim et al., 1998; Hsueh et al., 1997).

Nach einer Koexpression von myc-PSD-95 mit Flag-Sema4B, Flag-Sema4C oder Flag-Sema4G wurde in fixierten und permeabilisierten Cos-7 Zellen die Lokalisation der Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz mit α -Flag und α -myc Antikörpern untersucht. Nach Kotransfektion von pBK-Flag-Sema4B, pBK-Flag-Sema4C und pBK-Flag-Sema4G mit pBK-CMV waren die Semaphorine homogen in der Membran verteilt (Abb. 17 D-F). Die

Koexpression von PSD-95 induzierte die Bildung von Mikroaggregaten von PSD-95 und von Sema4B, Sema4C und Sema4G in Cos-7 Zellen (Abb. 17 A-C).

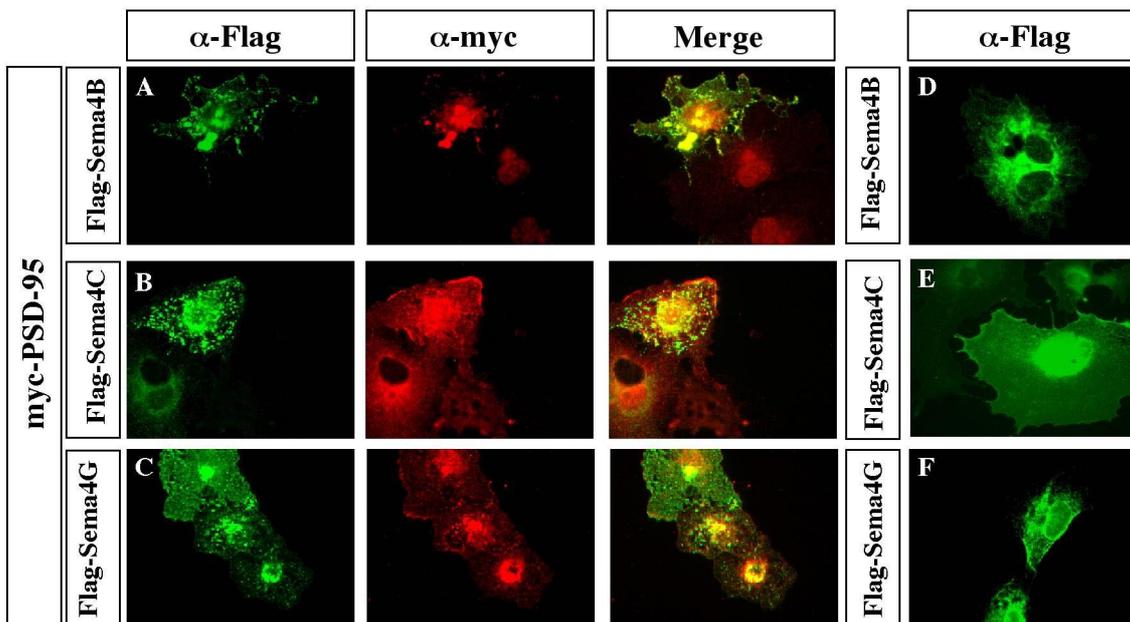


Abb. 17: PSD-95 induziert die Clusterbildung von Sema4B, Sema4C und Sema4G in Cos-7 Zellen. Cos-7 Zellen wurden mit pBK-Flag-Sema4B (A,D), pBK-Flag-Sema4C (B,E), pBK-Flag-Sema4G (C,F), pGWI-myc-PSD-95 (A-C) und pBK-CMV (D-F) transfiziert und nach 48 h in Kultur fixiert (n=4). Nach Permeabilisierung der Zellen wurden die Proteine mit α -Flag und α -myc Antikörpern nachgewiesen. Nach Koexpression von PSD-95 kam es zur Clusterbildung von Sema4B, Sema4C und Sema4G (A-C). Bei der Koexpression von Sema4B (D), Sema4C (E) und Sema4G (F) mit dem Leervektor pBK-CMV (D-F) kam es zu einer gleichmäßigen Expression. 1. AK.: Kaninchen α -myc, Maus α -Flag; 2. AK.: Ziege α -Kaninchen Alexa 594, Ziege α -Maus Alexa 488.

3.2.3 Sema4B bindet die PDZ-Domänen von PSD-95

Die folgenden Experimente konzentrierten sich auf Sema4B. Dies hatte zwei Gründe: Zum einen konnte ein Antikörper gegen Sema4B generiert werden, der weitergehende Untersuchungen ermöglichte (s. 3.2.6). Zum anderen ergab sich die Möglichkeit, eine *Sema4b* Mausmutante zu erhalten. Allerdings stand diese erst nach dem Ende dieser Arbeit zur Verfügung. Während des Verlaufs dieser Arbeit wurden drei Studien publiziert, die eine Interaktion von Sema4C und Sema4F mit PSD-95 beschrieben (Wang et al., 1999; Inagi et al., 2001; Schultze et al. 2001). Daher bot es sich an, die Interaktion von PSD-95 mit Sema4B in den Vordergrund zu stellen.

Um die Domäne von PSD-95 zu identifizieren, die für die Bindung von Sema4B verantwortlich ist, wurde dessen Interaktion mit Deletionsmutanten von PSD-95 getestet. Dazu wurden GST-Fusionsproteine der 1., 2., bzw. 1-3. PDZ-Domäne von PSD-95 in *E.coli* M15-

Zellen und Sema4B in HEK 293T-Zellen exprimiert. Als Negativkontrolle diente ein in M15-Zellen exprimiertes Par-6-GST-Fusionsprotein, das ebenfalls eine PDZ-Domäne enthält, die allerdings ein anderes Bindemotiv erkennt (Hung und Kemphuis, 1999). In einem *Pulldown*-Assay wurde das jeweilige GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose gekoppelt, mit dem Lysat der transfizierten Zellen inkubiert, und gebundenes Protein eluiert. Die Interaktion wurde nach SDS-PAGE der eluierten Proteine durch einen Western Blot überprüft. Alle drei PDZ-Domänen von PSD-95 nicht aber Par-6 binden Sema4B (Abb. 18).

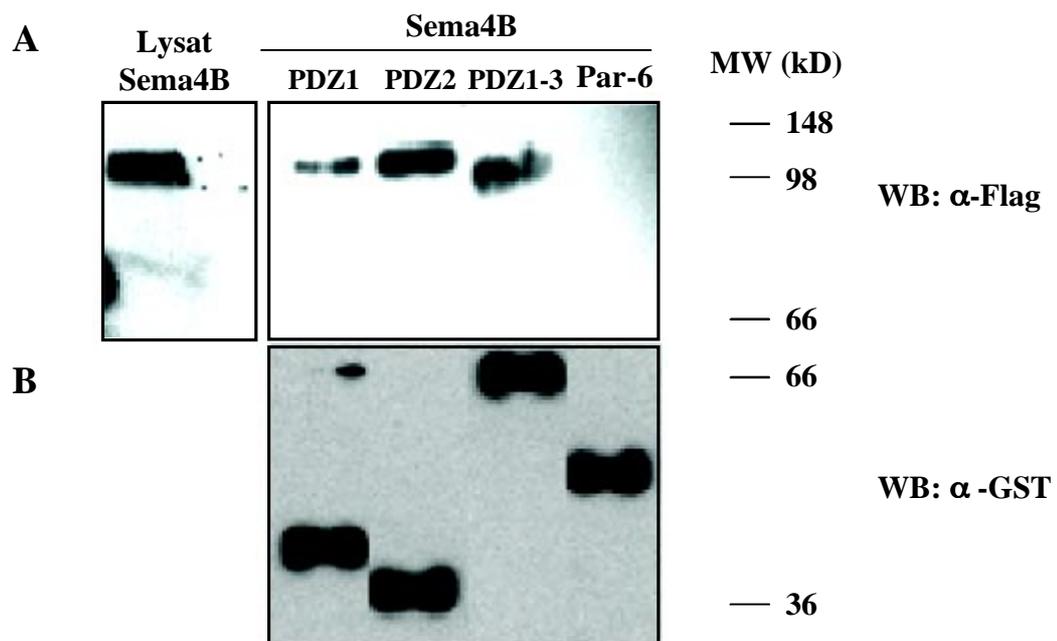


Abb. 18: Sema4B bindet die PDZ-Domänen von PSD-95. (A) Die Interaktion der unterschiedlichen PDZ-Domänen von PSD-95 (PDZ-1, PDZ-2 und PDZ 1-3) mit Sema4B wurde in einem *Pulldown*-Assay getestet. GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* M15 und pBK-Flag-Sema4B in HEK 293T-Zellen exprimiert. Die GST-Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose gebunden, mit dem Lysat transfizierter 293T-Zellen inkubiert, und die gebundenen Proteine mit Probenpuffer eluiert. Die eluierten Proben wurden mit einem 7,5%igem SDS-Gel aufgetrennt und Sema4B mittels Western Blot durch einen α-Flag Antikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente ein GST-Fusionsprotein von Par-6 (n=3). (B) Zur Kontrolle der Expression der GST-Fusionsproteine wurden die Eluate des *Pulldown* Ansatzes (Verdünnung 1:5) auf einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem α-GST Antikörper nachgewiesen. Die exprimierten Proteine der PDZ-Domänen von PSD-95 haben ein Molekulargewicht von 40 kD (PDZ1), 36 kD (PDZ2), 72 kD (PDZ1-3) und 48 kD Par-6). 1. AK.: Maus α-Flag, Kaninchen α-GST; 2.AK.: Ziege α-Maus-HRP, Ziege α-Kaninchen-HRP.

Aufgrund der unterschiedlichen Signalintensitäten konnte gezeigt werden, daß Sema4B präferentiell an die PDZ-Domäne 2 bindet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Spezifität der PDZ-Domäne von PSD-95 zu Sema4B nicht näher charakterisiert werden. Ein Konstrukt, das die PDZ-Domäne 3 von PSD-95 enthalten würde, könnte einen näheren Aufschluß auf die Spezifität der Bindung geben.

3.2.4 Generierung von Sema4B Deletionsmutanten

Sema4B ist ein 768 Aminosäuren großes Protein und enthält neben der 500 Aminosäuren großen Sema-Domäne eine Transmembran-Domäne und eine zytoplasmatische Domäne von 99 Aminosäuren. Die letzten C-terminalen Aminosäuren enthalten das PDZ-Bindemotiv. Um die Spezifität der Bindung von Sema4B an PSD-95 und deren Funktion zu untersuchen, wurden eine Reihe von Deletionsmutanten generiert. Dazu wurde die ganze zytoplasmatische Domäne, das PDZ-Bindemotiv oder die extrazelluläre Domäne deletiert (Abb. 19 A, *B,C,D*). Zusätzlich wurden die zytoplasmatische Domäne mit einem Myristoylierungssignal versehen, um sie an der Membran zu verankern (Abb. 19 A, *E*). Die Deletionsmutanten wurden jeweils mit einem N-terminalen Flag-Epitop versehen oder mit GFP fusioniert. Zur Kontrolle wurden die einzelnen Sema4B Mutanten heterolog in HEK 293T-Zellen exprimiert, und mittels Western Blot analysiert (Abb. 19 B). Die ermittelten Molekulargewichte entsprachen den erwarteten Größen von 98 kD (Flag-Sema4B, *A*), 80 kD (Flag-Sema4 Δ cyt, *B*), 97 kD (Flag.Sema4B Δ PDZ, *C*), 45 kD (GFP-Sema4B Δ N, *D*) und 50 kD (myr-GFP-Sema4Bcyt, *E*).

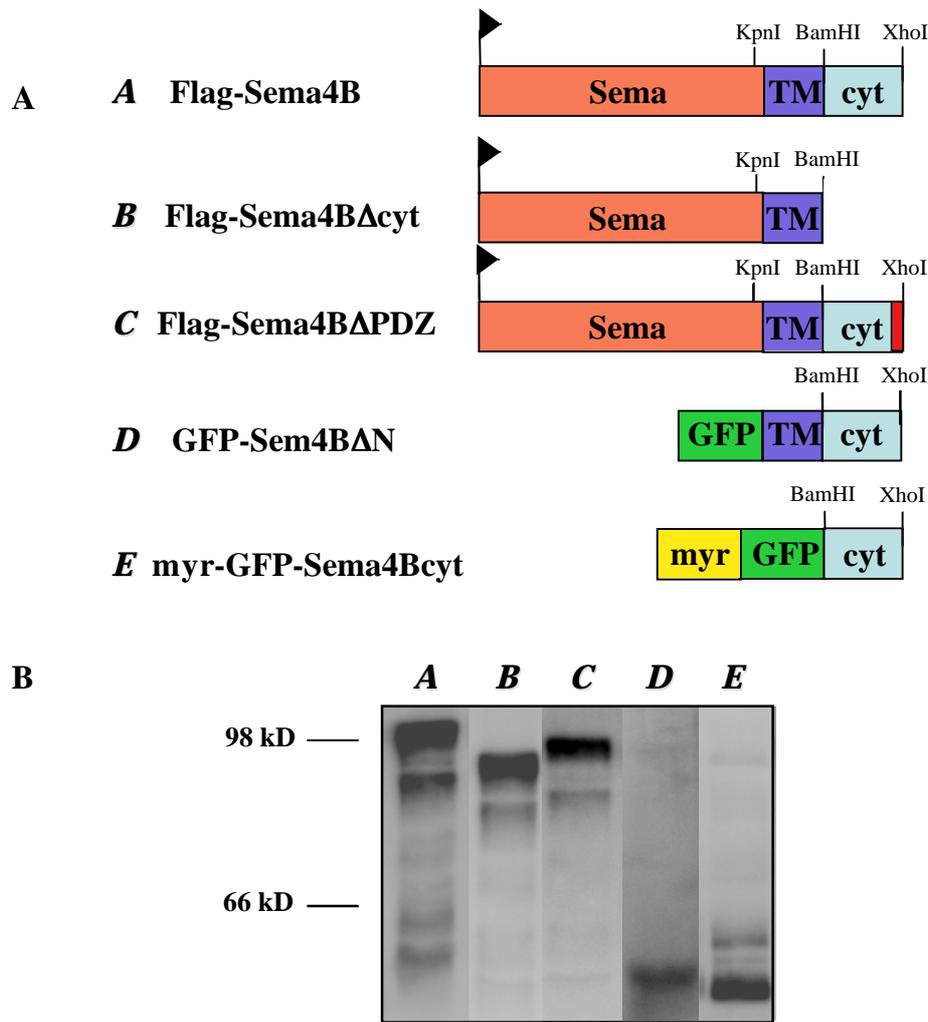


Abb. 19: (A) Schematische Darstellung von Sema4B Deletionsmutanten. Die dargestellten Expressionsvektoren für Flag- oder GFP-Fusionsproteine wurden auf der Basis der Plasmide pBK-CMV (**A-C, E**) und EGFP-Sema3A (**D**) (Probst und Püschel, unpubliziert) konstruiert. Eine detaillierte Beschreibung zur Konstruktion der Sema4B-Deletionsmutanten ist in Abschnitt 2.2.4 näher beschrieben. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. N = Extrazelluläre Domäne; Sema = Semaphorin-Domäne; TM = Transmembran-Domäne; cyt = zytoplasmatische Domäne; EGFP = Green Fluorescent Protein; myr = Myristoylierungssequenz.

(B) Western Blot-Analyse heterolog exprimierter Sema4B Deletionsmutanten. HEK 293T-Zellen wurden mit pBK-Flag-Sema4B (**A**), pBK-Flag-Sema4B Δ cyt (**B**), pBK-Flag-Sema4B Δ PDZ (**C**), EGFP-Sema4B Δ N (**D**) und pBK-myr-GFP-Sema4Bcyt (**E**) transfiziert, die Zellen nach 48 h in Kultur lysiert. 20 μ g Lysat wurden durch Western Blot mit Hilfe von α -Flag (**A-C, E**) und α -GFP (**D**) Antikörpern und anschließender Chemolumineszenz-Reaktion analysiert. Die ermittelten Molekulargewichte entsprachen den erwarteten Größen von 98 kD (Flag-Sema4B, **A**), 80 kD (Flag-Sema4B Δ cyt, **B**), 45 kD (Flag-Sema4B Δ PDZ, **C**), 50 kD (GFP-Sema4B Δ N, **D**) und 97 kD (pBK-myr-GFP-Sema4Bcyt, **E**). 1. AK.: Maus α -Flag, Maus α -GFP; 2. AK.: Ziege α -Maus-HRP.

3.2.5 Der C-Terminus von Sema4B vermittelt die Bindung von PSD-95 in Cos-7 Zellen

Die in 3.2.4 beschriebenen Deletionsmutanten wurden zunächst dazu verwendet, die Bindung von PSD-95 an Sema4B zu untersuchen. Sowohl Flag-Sema4B Δ cyt als auch Flag-Sema4B Δ PDZ waren nach Koexpression mit myc-PSD-95 gleichmäßig an der Oberfläche

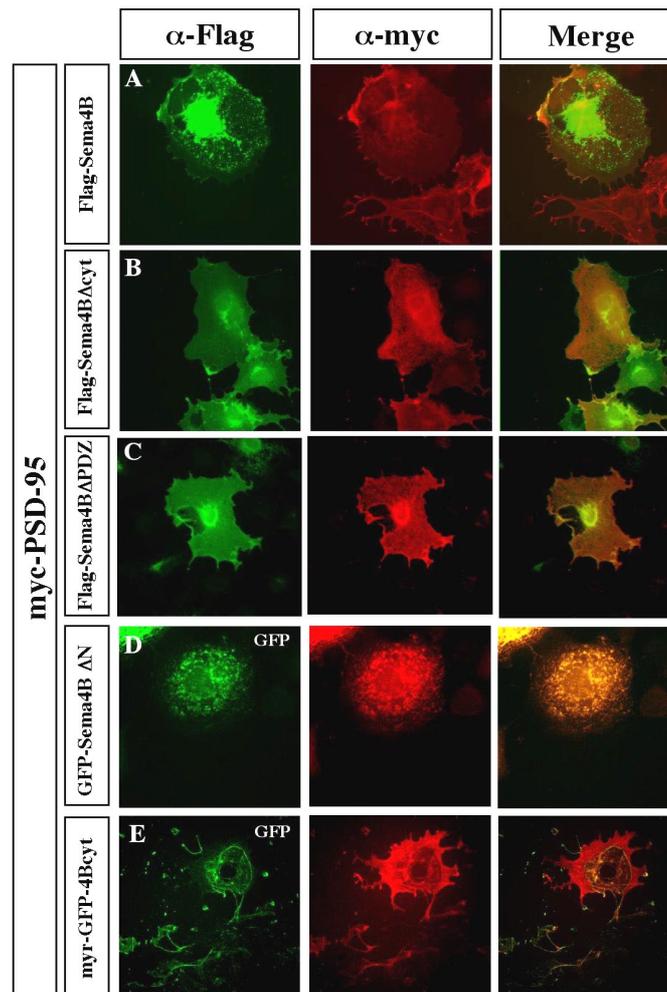


Abb. 20: Koexpression von Sema4B und PSD-95 in Cos-7 Zellen. Cos-7 Zellen wurden mit pGWI-myc-PSD-95 und pBK-Flag-Sema4B (A), pBK-Flag-Sema4B Δ cyt (B), pBK-Flag-Sema4B Δ PDZ (C), GFP-Sema4B Δ N (D) und pBK-myr-GFP-Sema4Bcyt (E) transfiziert (n=3) und nach 48 h Kultur fixiert, permeabilisiert, und anschließend mit α -Flag bzw. α -myc Antikörpern gefärbt. GFP-myr-Sema4Bcyt und Sema4B Δ N wurden aufgrund der Fluoreszenz von EGFP nachgewiesen. Das PDZ-Bindemotiv in der zytoplasmatischen Domäne von Sema4B ermöglichte eine Bildung von PSD-95/Sema4B-Klustern (A). Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne (B) bzw. des PDZ-Bindemotivs (C) führte zu einer gleichmäßigen Verteilung von Sema4B in der Zellmembran. Koexpression von pBK-Sema4B Δ N und pBK-myc-PSD-95 (D) führte ebenfalls zum Klustern. Allerdings war die Expression sowohl von GFP-Sema4B Δ N als auch pGWI-myc-PSD-95 im Vergleich zu anderen Transfektion relativ gering. Bei Kotransfektion von pBK-myr-GFP-Sema4Bcyt und pBK-myc-PSD-95 kam es zu einer gürtelartigen Anordnung von Sema4B (E). 1. AK.: Maus α -Flag, Kaninchen α -myc; 2. AK.: Ziege α -Maus Alexa 488, Ziege α -Kaninchen Alexa 594.

verteilt (Abb. 20 B, C); es war keine Klusterbildung von Sema4B Δ cyt oder Sema4B Δ PDZ zu beobachten (Abb. 20 B, C). PSD-95 bildete jedoch schwache Mikroaggregate (Abb. 20 A). Im Vergleich von Sema4B und Sema4B Δ PDZ ist erkennbar, daß die Deletion der letzten drei Aminosäuren ausreichend war, eine Klusterbildung von Sema4B zu verhindern. Dagegen zeigte die Deletion der Ektodomäne (GFP-Sema4B Δ N) keinen starken Einfluß auf die Klusterbildung (Abb. 20 D). Die Expression von GFP-Sema4B Δ N in Cos-7 Zellen war jedoch im Vergleich zu den anderen Deletionsmutanten relativ schwach, was auch im Western Blot zu erkennen ist (Abb. 19 B). Erstaunlicherweise führte die Koexpression von myr-GFP-Sema4Bcyt und myc-PSD-95 zu einer homogenen Verteilung von PSD-95. myr-GFP-Sema4Bcyt ist in Regionen der Zelle konzentriert, die gürtelartig angeordnet sind (Abb. 20 E). Dieses Phänomen war nur bei Koexpression der myristoylierten Deletionsmutante mit PSD-95 zu beobachten.

Um diesen Effekt von myr-GFP-Sema4B näher zu untersuchen, wurde nach Expression verschiedener Proteine mit myr-Signal in Cos-7 Zellen mit Rhodamin- Phalloidin Aktin-Filamente sichtbar gemacht. Damit konnten mögliche Effekte auf das Zytoskelett beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden ein Expressionsplasmid für eine myristoylierte zytoplasmatische Domäne von Sema4A (myr-GFP-Sema4Acyt) und als Kontrolle EGFP mit Myristoylierungssignal exprimiert. In den Kontrolltransfektionen mit myr-GFP waren wie in untransfizierten Zellen deutliche Stressfasern zu erkennen (Abb. 21 C). Die Expression von myr-Sema4Bcyt (Abb. 21 A), nicht aber von myr-GFP-Sema4Acyt führte dagegen zu einer Umorganisation des Zytoskeletts. Es war ein aktinreicher Zellrand zu erkennen, der komplementär zur Sema4B-Expression verlief.

Diese starke Umorganisation des Aktinzytoskeletts durch myr-GFP-Sema4Bcyt ähnelt Effekten einer Überexpression von einigen Rho-ähnlichen GTPasen. Eine genauere Analyse dieses Effekts konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher durchgeführt werden.

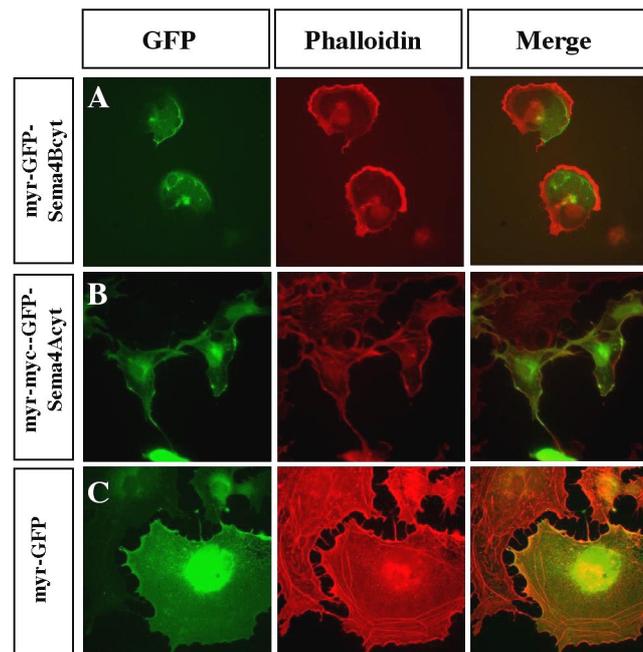


Abb. 21: Effekt von pBK-GFP-myr-Sema4Bcyt auf das Zytoskelett. Cos-7 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für pBK-myr-GFP-Sema4B (A), pBK-myr-myc-GFP-Sema4A (B) und myr-GFP (C) transfiziert (n=3), nach 48 h in Kultur fixiert und permeabilisiert. Zur Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts wurde Rhodamin-Phalloidin verwendet. Die GFP-Fluoreszenz zeigte die Expression der Fusionsproteine. Expression von myr-GFP-Sema4Bcyt (A), nicht aber myr-myc-GFP-Sema4Acyt (B) und myr-GFP (C), führte zu einer Umorganisation des Zytoskeletts. Es entstand ein breiter aktinreicher Zellrand, komplementär zur Sema4B-Expression.

3.2.6 Generierung und Charakterisierung des α -Sema4B₀₉ Antikörpers

Um die Expression von Sema4B in Geweben zu charakterisieren, wurde ein Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne (99 AS) von Sema4B generiert. Die zytoplasmatische Domänen der 7 Mitglieder der Klasse 4 zeigen die geringste Sequenzhomologie untereinander. Die kodierende Sequenz der zytoplasmatischen Domäne wurde mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE30 kloniert (QIAGEN). Dieser Vektor ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine mit einem N-terminalen 6XHis-Epitop (6 konsekutive Histidin-Reste), die eine hohe Affinität für eine Ni-NTA-Matrix (*nickel-nitrilotriacetic metal affinity matrix*, Qiagen) haben und so eine einfache und effektive Aufreinigung von Proteinen erlauben (Schmitt et al., 1993). Da das 6XHis-Epitop zudem eine geringe Immunreaktivität zeigt, kann das rekombinante Protein direkt als Antigen benutzt werden, ohne daß das Epitop entfernt werden muss. 2 mg rekombinantes Sema4B_{cyt} wurden aus 3 l Bakterienkultur mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt und als Antigen zur Immunisierung von zwei Kaninchen benutzt. Die resultierenden Seren α -Sema4B₀₉ und α -Sema4B₁₀ wurden zunächst in Western Blot-Analysen charakterisiert. In den ersten Analysen zeigte sich, daß α -Sema4B₁₀ in Western Blots von rekombinanten Sema4B zusätzlich mehrere unspezifische Banden er-

kennt (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurde für die weiteren Experimente α -Sema4B_09 verwendet. Um die Spezifität des α -Sema4B_09 Antikörpers zu testen, wurden HEK 293T-Zellen mit den Expressionsplasmiden pBK-Flag-Sema4B, pBK-Flag-Sema4C oder pBK-CMV transfiziert und die Lysate im Western Blot untersucht. Der α -Sema4B_09 Antikörper reagierte spezifisch mit rekombinanten Sema4B, nicht aber mit Sema4C oder andere Proteine in 293T-Zellen (Abb. 22 A). Eine Inkubation der Membran mit α -Flag Antikörper zeigte die Expression vergleichbarer Mengen von Sema4B und Sema4C (Abb. 22 D). In einem zweiten Ansatz wurde die Spezifität Des α -Sema4B_09 Antikörpers durch ein Kompetitionsexperiment analysiert. Hierbei wurden Lysate wie oben beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Bot analysiert. α -Sema4B_09 wurde jeweils mit 5 μ g bzw. 25 μ g mit in *E. coli* M15-Zellen exprämiertem und gereinigtem Antigen für 2h bei 4 °C vorinkubiert. Das Antigen/ Antikörper-Gemisch wurde anschließend in Blocklösung 1 verdünnt und für eine Western Blot-Analyse verwendet. Nach Applikation von 5 μ g Antigen war das Signal für rekombinantes Sema4B noch nachweisbar (Abb. 22 B). Bei der höheren Antigen-Konzentration war kein Signal mehr für Sema4B detektierbar (Abb. 22 C).

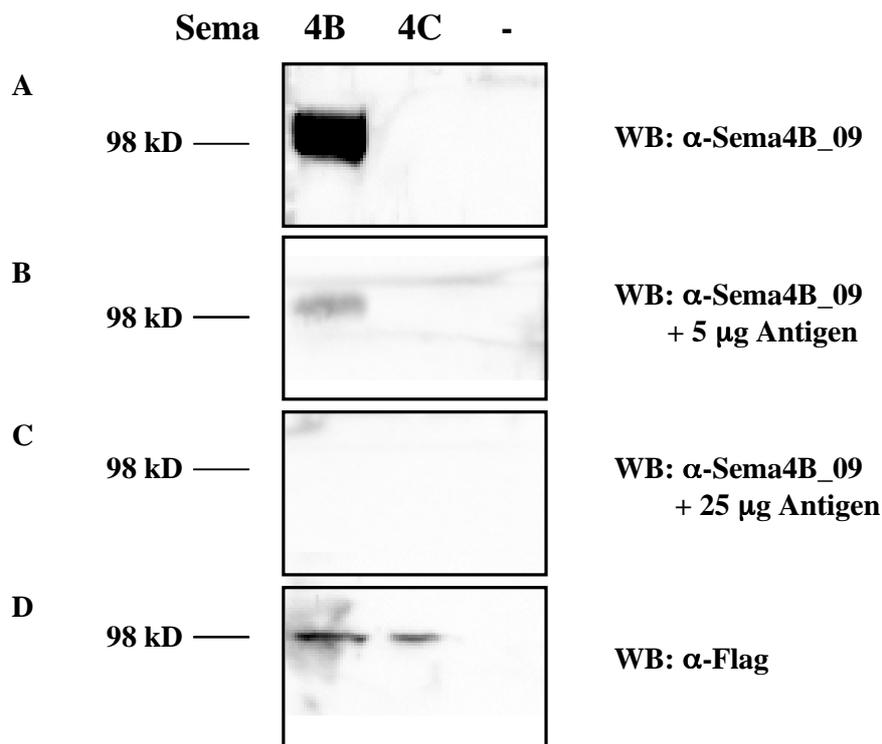


Abb. 22: Nachweis der Spezifität des α -Sema4_09 Antikörpers. HEK 293T Zellen wurden mit pBK-Flag-Sema4B, pBK-Flag-Sema4C oder pBK-CMV (-) transfiziert und 10 μ g Lysat nach 48 h Kultur im Western Blot analysiert. α -Sema4B_09 erkennt spezifisch rekombinantes Sema4B, nicht aber Sema4C oder andere Proteine in HEK 293T-Zellen. Zum Nachweis der Spezifität wurde der α -Sema4B_09-Antikörper mit 5 μ g (**B**) und 25 μ g Antigen (zytoplasmatische Domäne von Sema4B) (**C**) für 2 h bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit diesen Ansätzen inkubiert (**B,C**), und die Proteine durch eine Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Bei einer geringen Menge Antigen (5 μ g) war noch eine schwache Bande zu erkennen, die bei einer höheren Konzentration von Antigen (25 μ g) nicht mehr sichtbar war. Als Kontrolle für die Expression wurden die Proteine mit α -Sema4B_09 Antikörper (**A**) und α -Flag Antikörper (**D**) nachgewiesen. 1. AK.: Kaninchen α -Sema4B, Maus α -Flag; 2. AK.: Ziege α -Maus-HRP, Ziege α -Kaninchen-HRP.

Die Spezifität des α -Sema4B_09 Antiserums wurde zusätzlich durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft. Hierzu wurden Cos-7 Zellen mit dem Expressionsplasmid pBK-Flag-Sema4B transfiziert, und die fixierten, permeabilisierten Zellen mit α -Sema4B_09 und dem α -Flag Antikörper gefärbt. Das Sema4B_09 Serum erkannte spezifisch rekombinantes Flag-Sema4B (Abb. 23). Untransfizierte Zellen zeigten dagegen keine Färbung (Daten nicht gezeigt). Mit diesen drei Ansätzen ist gezeigt, daß α -Sema4B_09 Sema4B, nicht aber andere Semaphorine erkennt.

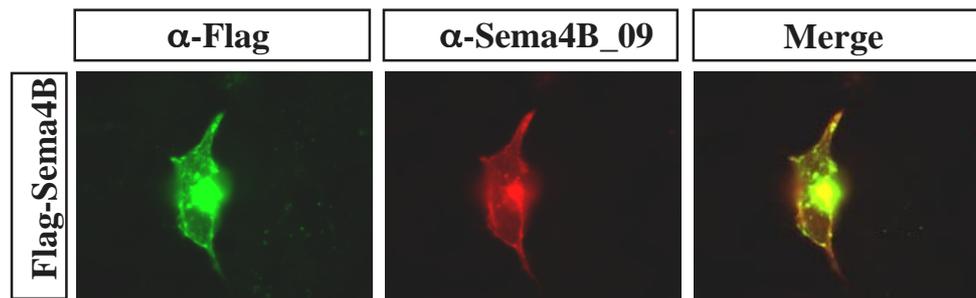


Abb. 23: Analyse der Spezifität von α -Sema4B_09. Cos-7 Zellen wurden mit pBK-Flag-Sema4B transfiziert, nach 48 h in Kultur fixiert und mit α -Flag Antikörper und α -Sema4B_09 Serum gefärbt. Das Sema4B_09 Serum erkennt spezifisch rekombinantes Flag-Sema4B. 1.AK.: Maus α -Flag, Kaninchen α -Sema4B_09; 2. AK.: Ziege α -Maus-Alexa 488, Ziege α -Kaninchen-Alexa 594.

3.2.7 Die Expression von Sema4B in neuronalen Geweben

Mit Hilfe des α -Sema4B_09 Antikörpers wurde die Expression von Sema4B in neuronalen Geweben und während der Embryonalentwicklung untersucht. Membranen von Cerebellum, Cortex und Rückenmark unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden präpariert, durch Solubilisierung und Ultrazentrifugation fraktioniert und mittels Western Blot analysiert (Abb. 24). In Cerebellum und Rückenmark konnte Sema4B zwischen E14 und P28 nachgewiesen werden, mit der stärksten Expression zwischen P0 und P9 (Abb. 24 A, C). Im Cortex dagegen war besonders an E14 eine starke Expression nachweisbar. Da in diesem Stadium der Cortex noch nicht ausgebildet ist, wurde die dorsale Hirnregion von E14 Embryonen für die Analyse genommen, diese enthält daher nicht nur cortikale Neurone. Auffällig ist, daß α -Sema4B_09 in allen Lysaten einen Doppelbande detektiert. Dieses Phänomen war in allen Versuchen zu beobachten, und kann auf eine posttranslationale Modifizierung oder alternatives Spleißen von Sema4B zurückzuführen sein.

Diese Daten bestätigen die durch *in situ*-Hybridisierung gezeigte neuronale Expression von Sema4B (Püschel, 1995). Es gelang im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mit dem α -Sema4B_09 Antikörper Immunfärbungen von Schnitten des Gehirns durchzuführen.

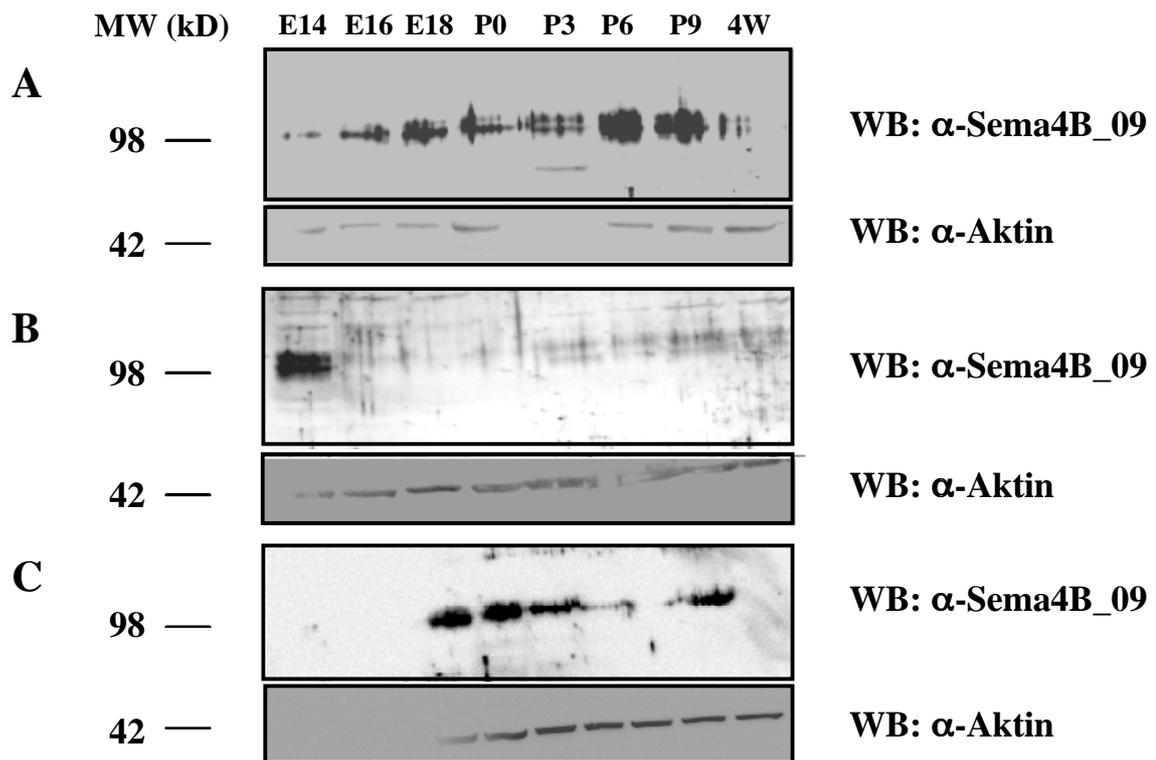


Abb. 24: Expression von Sema4B in neuronalen Geweben während der Entwicklung. Cerebellum (A), Cortex (bei E14 Gehirn) (B) und Rückenmark (C) wurden von Mäusen unterschiedlicher Entwicklungsstadien präpariert, homogenisiert, und unlösliches Material durch eine kurze Zentrifugation bei 2000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde mit 2% Triton X-100 solubilisiert. Anschließend wurden die Zellmembranen und das Zytosol durch eine weitere Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 45000 rpm entfernt. Die Verwendung vergleichbarer Proteinmengen wurden mit einem α -Aktin Antikörper überprüft. 10 μ g Lysat des Überstandes wurden mit einem 7,5%igem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot mit dem α -Sema4B_09 Antikörper und anschließender Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Neben der Proteinbestimmung nach Lowry wurde als Kontrolle für die Proteinmenge eine Inkubation der Membranen mit einem α -Aktin Antikörper durchgeführt. Sema4B wird im Cerebellum und Rückenmark während der Entwicklung gleichmäßig exprimiert (A, C). Im Cerebellum ist die stärkste Expression zwischen P6 und P9 zu beobachten (A). Der Cortex ist bei E14 noch nicht so weit entwickelt, daß er eine saubere Präparation zuläßt. Aus diesem Grunde wurde bei E14 Embryonen die dorsale Region des Gehirns verwendet. Dort ist eine starke Sema4B Expression zu beobachten; danach ist die Expression relativ gering (B). 1. AK: Kaninchen α -Sema4B_09, Maus α -Aktin; 2. AK.: Ziege α -Kaninchen-HRP, Ziege α -Maus-HRP.

3.2.8 PSD-95 und Sema4B interagieren *in vivo*

Um die Interaktion von PSD-95 und Sema4B auch *in vivo* nachzuweisen, wurden die Membranfraktionen des Gehirns neugeborener Mäuse über einen Sucrose-Gradienten isoliert. Sowohl Sema4B als auch PSD-95 waren in der Membran nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Für Immunpräzipitationen wurden die Membranfraktionen mit PBS, α -Sema4B_09, α -Sema4B_10 oder Präimmun-Serum inkubiert, und die Antikörper mit Protein-G Agarose präzipitiert. Lysat und Immunpräzipitate wurden mittels Western Blot unter Verwendung α -PSD-95 und α -Sema4B_09 analysiert. Immunpräzipitationen mit α -Sema4B_09, nicht aber

mit PBS, Präimmun-Serum und α -Sema4B_10 kopräzipitierte PSD-95 (Abb. 25). Somit konnte eine Interaktion von PSD-95 und Sema4B auch *in vivo* nachgewiesen werden.

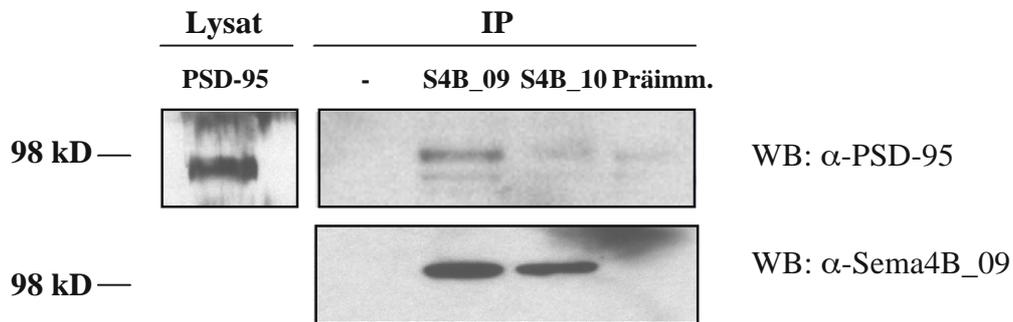


Abb. 25: PSD-95 und Sema4B bilden einen Komplex *in vivo*. Die Membranfraktion wurde aus den Lysaten von Gehirnen neugeborener Mäuse über einen Sukrose-Gradienten isoliert, mit PBS (-), Sema4B_09-Serum, Sema4B_10-Serum und Präimmun-Serum inkubiert, und Antikörper mit Protein-G Agarose immunpräzipitiert. Lysate und Immunpräzipitate wurden mittels Western Blot unter Verwendung von α -PSD-95 und α -Sema4B_09 Antikörpern und anschließender Chemolumineszenz-Reaktion analysiert. Es konnte eine Interaktion von PSD-95 mit Sema4B nachgewiesen werden. 1. AK.: Maus α -PSD-95, Kaninchen α -Sema4B_09; 2. AK.: Ziege α -Maus-HRP, Ziege α -Kaninchen-HRP.

3.2.9 **Sema4B kolokalisiert mit postsynaptischen Markern in hippocampalen Neuronen**

Um die Funktion der Interaktion von Sema4B und PSD-95 näher zu untersuchen, wurden primäre Kulturen primärer hippocampaler Kulturen verwendet. Dazu wurde der Hippocampus aus E18 Ratten präpariert, die Neuronen dissoziiert und in Kultur genommen. Zunächst wurde die Verteilung von endogenem PSD-95 und Sema4B in hippocampalen Neuronen untersucht. Verschiedene prä- und postsynaptische Markern wurden dazu verwendet, um nachzuweisen, daß Sema4B in der postsynaptischen Membran lokalisiert ist. α -Sema4B_09 färbte in hippocampalen Kulturen an 21 Tagen in Kultur (*DIV*) punktförmige Strukturen an (Abb. 26 A). Bei einer Doppelfärbung war zu erkennen, daß Sema4B mit PSD-95 kolokalisierte (Abb. 26 B). Als zweites postsynaptisch lokalisiertes Protein wurde die Verteilung von ProSAP-1 untersucht. Dies ist ein PDZ-Domänen Protein, das an der Organisation der PSD beteiligt ist. ProSAP-1 erkennt ein PDZ-Bindemotiv, das dem C-Terminus von Sema4B ähnelt. Eine Interaktion konnte biochemisch verifiziert werden (diese Arbeit; Badde, *Molekulare Analysen der Interaktion von Semaphorinen und PDZ-Domänen Proteinen*, Diplomarbeit, WWU, November, 2002). Wie in Abb. 26 C zu erkennen ist, kolokalisieren Sema4B und ProSAP-1 an 21 *DIV*, wobei 88% der ProSAP-1⁺ Strukturen auch mit α -Sema4B_09 gefärbt wurden. Ein wichtiger Bestandteil hippocampaler Synapsen ist der NMDA-Rezeptor (NMDA-R), der in der PSD exzitatorischer Synapsen durch PDZ-Domänen Proteine verankert wird (Abb. 6). Bei der Synaptogenese ist PSD-95 in hippocampalen Neuronen in der Synapse früher nachweisbar als der NMDA-R (Rao et al., 1998). Aus diesem Grunde wurde die Kolokalisation des NMDA-R mit Sema4B näher untersucht. Bei Quantifizierung der punktförmigen Strukturen, die durch α -Sema4B_09 und α -NR-1 angefärbt wurden, wurden 76 % der NR-1⁺ Strukturen auch mit α -Sema4B_09 gefärbt (Abb. 26 D).

Als ein präsynaptischer Marker wurde die Lokalisation von Bassoon nachgewiesen, ein Zinkfinger-Protein, das ausschließlich in der aktiven Zone verankert ist (tom Dieck et al., 1998; Boeckers et al., 1999). Einzelne punktförmige Strukturen von Sema4B⁺ und Bassoon⁺ Zellen überlappten nur partiell (Abb. 26 E, Vergrößerung). Dieses Bild ähnelte den von Boeckers et al. (1999) veröffentlichten Analysen von ProSAP-1 und Bassoon, die prä- und postsynaptische Strukturen mit einem ähnlichen Mustern zeigten. Prä- und postsynaptische Strukturen liegen räumlich dicht beieinander, sind jedoch nicht deckungsgleich.

Aus diesem Daten kann geschlossen werden, daß Sema4B und PSD-95 in hippocampalen Neuronen an 21 *DIV* in postsynaptischen Spezialisierungen kolokalisierten. Sema4B kolokalisierte ausschließlich mit den postsynaptischen Markern ProSAP-1 und NMDA-R1, nicht aber mit dem präsynaptischen Marker Bassoon.

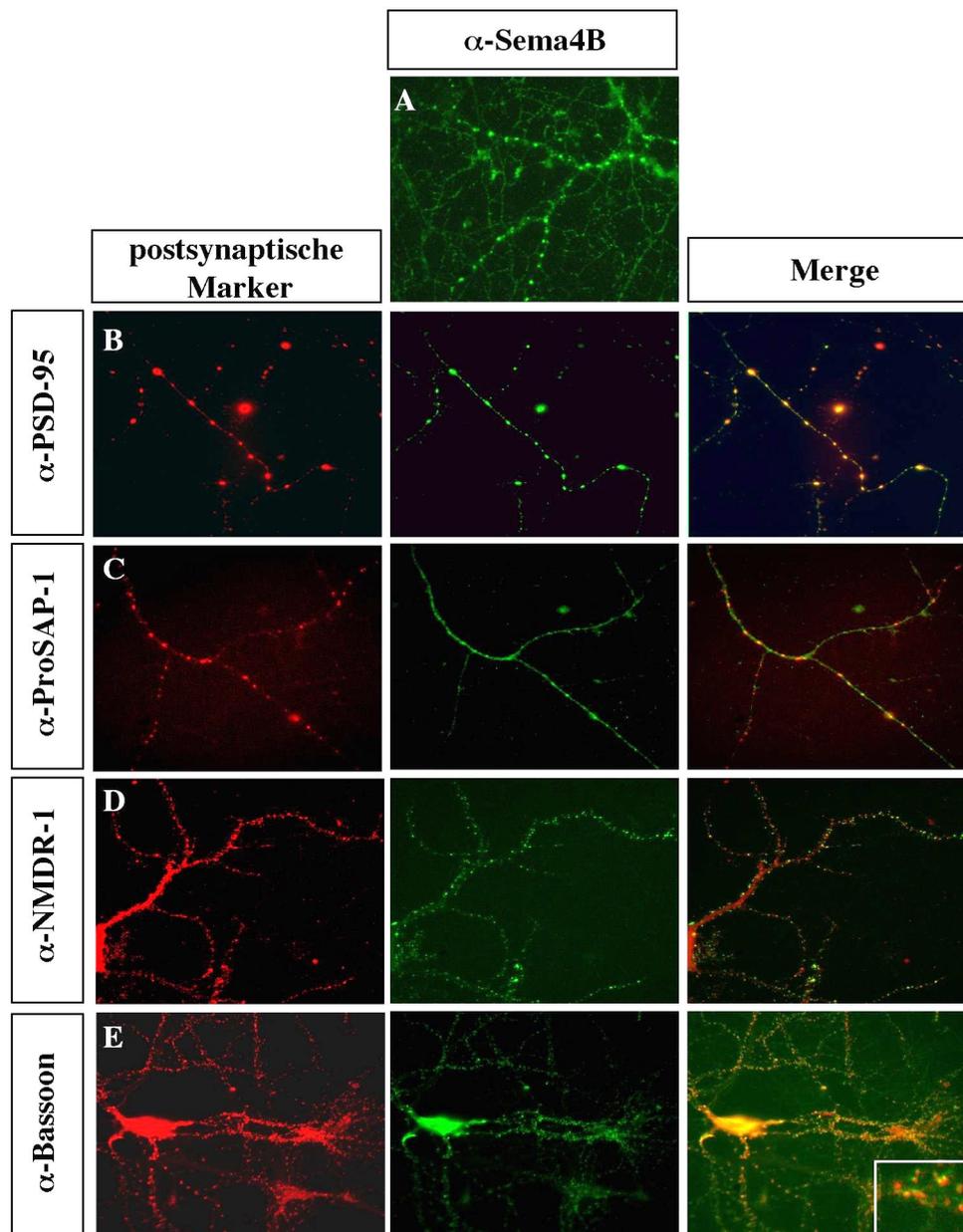


Abb. 26: Sema4B kolokalisiert mit postsynaptischen Markern in hippocampalen Neuronen. Kulturen primärer hippocampaler Neuronen wurden nach 21 *DIV* fixiert und mit α -Sema4B_09 (**A**), α -PSD-95 (**B**), α -ProSAP-1 (**C**), α -NMDR-1 (**D**) und α -Bassoon (**E**) Antikörpern gefärbt (n=3). (**A**) Sema4B war in punktförmigen Strukturen lokalisiert und kolokalisierte mit den postsynaptischen Markern PSD-95 (**B**), ProSAP-1 (**C**) und NR-1 (**D**), jedoch nur partiell mit dem präsynaptischen Marker Bassoon (siehe Vergrößerung, **E**).

3.2.10 Interaktion von Sema4B und PSD-95 nach Kotransfektion hippocampaler Neurone

Wie von Bradke und Dotti beschrieben (2000), können schon an Tag 1 der Kultur (1 *DIV*) hippocampaler Neuronen die ersten Auswüchse, die später zu Axonen und Dendriten heranreifen, beobachtet werden (Abb. 27 A). Zunächst wurden die Zellen am Tag drei in Kultur (3 *DIV*) mit den Expressionsplasmiden pBK-Flag-Sema4B und pGW1-myc-PSD-95 transfiziert und an 4 *DIV*, 10 *DIV* und 21 *DIV* durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 27 B). An 4 *DIV* war rekombinantes Sema4B ausschließlich in Wachstumskegeln nachweisbar. PSD-95 war hingegen in den Neuriten in punktförmigen Strukturen lokalisiert. An Tag 10 *DIV* war Sema4B ebenfalls in punktförmigen Strukturen zu finden, die jedoch nicht mit den PSD-95⁺ Strukturen kolokalisierten. Es konnte von Rao et al. (1998) gezeigt werden, daß PSD-95 zu diesem Zeitpunkt schon in Synapsen hippocampaler Kulturen lokalisiert ist. Das konnte in Färbungen mit dem synaptischen Marker Synaptophysin-1 verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Erst an 21 *DIV* konnte eine Kolokalisation von PSD-95 und Sema4B nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist der Prozess der Synaptogenese abgeschlossen (Bradke und Dotti, 2000). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Kolokalisation von Sema4B und PSD-95 erst in 21 Tage alten Kulturen zu sehen ist und deuten darauf hin, daß Sema4B möglicherweise von PSD-95 in Synapsen rekrutiert werden könnte.

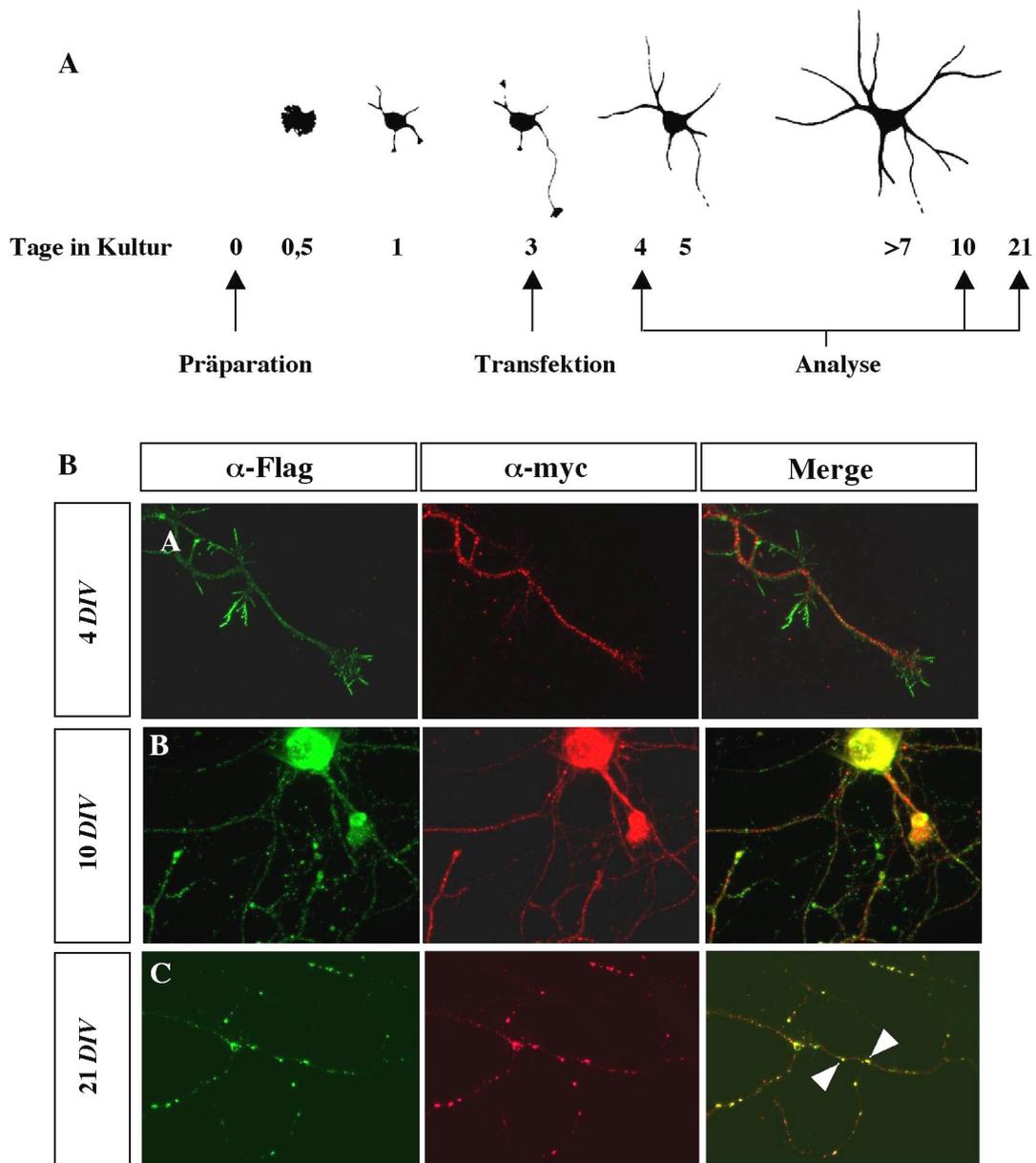
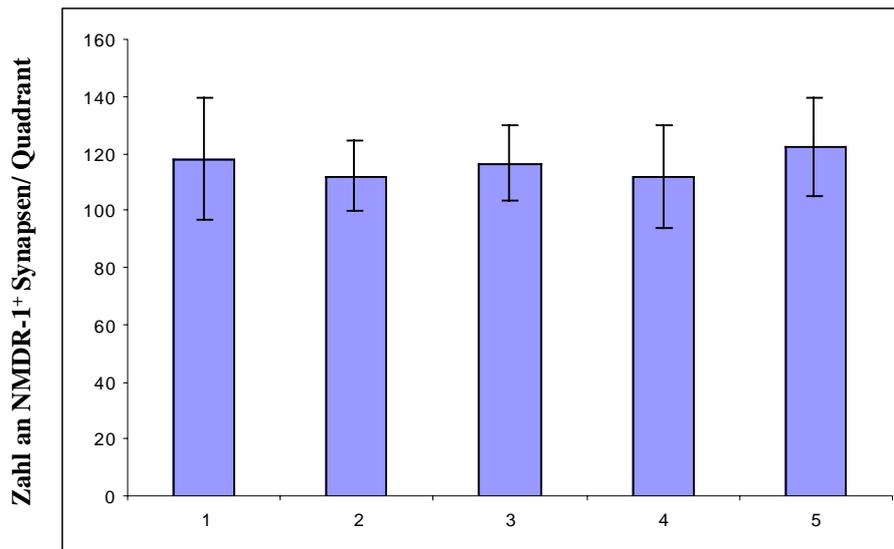


Abb. 27: (A) Experimenteller Ansatz zur funktionellen Analyse von Sema4B in primären hippocampalen Neuronen. Primäre hippocampale Neuronen wurden aus E18 Ratten Embryonen präpariert, dissoziiert und in Kultur genommen. An Tag 3 der Kultur (3 DIV) wurden die Neuronen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion transfiziert und an Tag 4, Tag 10 oder Tag 21 der Kultur durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert (modifiziert nach Bradke und Dotti, 2000). **(B)** Sema4B und PSD-95 kolokalisieren nach Kotretransfektion in hippocampalen Kulturen nach 21 DIV. Primäre hippocampale Kulturen wurden am Tag 3 der Kultur (DIV) mit Expressionsvektoren für pBK-Flag-Sema4B und pGWI-myc-PSD-95 transfiziert und nach 4 **(A)**, 10 **(B)** und 21 Tagen **(C)** fixiert und analysiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde mit α -Flag und α -myc Antikörpern nachgewiesen. Erst an 21 DIV kolokalisierten Sema4B und PSD-95 in punktförmigen Strukturen (Pfeil). 1. AK.: Maus α -Flag, Kaninchen α -myc; 2. AK.: Ziege α -Maus Alexa 488, Ziege α -Kaninchen Alexa 594.

3.2.11 Sema4B Überexpression verändert nicht die Zahl NR-1⁺ Synapsen

Nachdem eine Kolo-kalisation von Sema4B und PSD-95 in hippocampalen Neuronen gezeigt werden konnte, galt es, die Funktion dieser Interaktion funktionell zu untersuchen. Dazu wurde getestet, ob die Expression von exogenem Sema4B die Entwicklung und Zahl von Synapsen beeinflussen kann. Hippocampale Neuronen wurden an 3 *DIV* mit Expressionsplasmiden für myc-PSD-95 und Flag-Sema4B oder Deletionskonstrukten von Sema4B (Abb. 19) transfiziert, und anschließend die Zahl NR-1⁺ Synapsen an 21 *DIV* analysiert. Als Kontrolle wurden die Neuronen mit PSD-95 und pBK-CMV transfiziert (Abb. 28). Kulturen hippocampaler Neuronen zeigen eine hohe Diversität. Um den Effekt der exprimierten Proteine zu analysieren, wurden daher pro Deckglas in vier Quadranten die Zahl der NR-1⁺ Synapsen bestimmt. Dabei wurden auch Bereiche unterschiedlicher Zelldichte ausgewertet. Zunächst wurde der Grad der Kolo-kalisation der einzelnen rekombinanten Proteine bestimmt. 78% der Flag-Sema4B⁺ Strukturen waren auch NR-1⁺ gefärbt. 93% der Sema4B⁺ und 95% der NR-1⁺ Strukturen überlappten hierbei auch mit α -PSD-95 gefärbten punktförmigen Strukturen. Es konnte daher angenommen werden, daß die Synapsen, die positiv für NR-1 waren, auch Sema4B und PSD-95 enthielten. Nach Quantifizierung der NR-1⁺ Synapsen konnte keine Veränderung in der Anzahl der Synapsen festgestellt werden. Die Kotransfektion von PSD-95 mit Sema4B oder verschiedenen Sema4B Deletionsmutanten hatte keinen Einfluß auf die Entwicklung von Synapsen (Abb. 28).



- 1 pGWI-myc-PSD-95 + pBK-Flag-Sema4B
- 2 pGWI-myc-PSD-95 + pBK-Flag-Sema4BΔcyt
- 3 pGWI-myc-PSD-95 + GFP-Sema4BΔN
- 4 pGWI-myc-PSD-95 + pBK-Flag-Sema4BΔPDZ
- 5 pGWI-myc-PSD-95 + pBK-CMV

Abb. 28: Sema4B und PSD-95 Überexpression verändern nicht die Zahl der NR-1⁺ Synapsen in primären hippocampalen Neuronen. Primäre hippocampale Neuronen wurden nach 3 *DIV* mit Expressionsvektoren für pBK-Flag-Sema4B (1), pBK-Flag-Sema4BΔcyt (2), GFP-Sema4BΔN (3), pBK-Flag-Sema4BΔPDZ (4), pBK-CMV (5) und pGWI-myc-PSD-95 (1-5) transfiziert (n=3). Nach 21 *DIV* wurden die Zellen fixiert und durch indirekte Immunfluoreszenz mit den Antikörpern α-Flag, α-myc oder α-myc, α-NR-1, oder α-Flag, α-NR-1 analysiert. GFP-Sema4BΔN wurde anhand der GFP-Fluoreszenz nachgewiesen. In den Doppeltransfektionen kolokalisierten Sema4B und NR-1 zu 78%, Sema4B und PSD-95 zu 93% und PSD-95 und NR-1 zu 95%. Es konnte daher angenommen werden, daß NR-1⁺ Synapsen auch Sema4B und PSD-95 positiv waren. Pro Transfektion wurden 4 Ansätze ausgewertet, wobei NR-1⁺ Synapsen in je vier Quadranten ausgezählt wurden. Der Mittelwert mit Fehlerbalken ist angegeben. Die Überexpression von Sema4B und PSD-95 beeinflusste nicht die Synapsenzahl und ist mit den Kontrollen vergleichbar. 1. AK.: Maus α-Flag, Maus α-myc, Kaninchen α-myc, Kaninchen α-NMDR-1; 2. AK.: Ziege α-Maus-Alexa 488, Ziege α-Kaninchen Alexa 594.

Die Überexpression von PSD-95 in hippocampalen Neuronen reicht aus, um die Entwicklung von Synapsen zu beschleunigen (Husseini et al., 2000; Pawson, persönliche Kommunikation). Um diesen Effekt auszuschließen und durch Expression verschiedener Mutanten die Funktion von endogenem Sema4B zu stören, wurden primäre hippocampale Neuronen an 3 *DIV* mit entsprechenden Vektoren transfiziert und an 10 *DIV* und 21 *DIV* mit α-Flag und α-NR-1 Antikörpern analysiert. Dabei könnten die Expressionsplasmide Flag-Sema4BΔcyt sowie Flag-Sema4BΔPDZ durch das fehlende PDZ-Bindemotiv vermutlich eine Lokalisation in Synapsen verhindert. Desweiteren würde GFP-Sema4BΔN wahrscheinlich mit endogenem Sema4B um die Bindung an PSD-95 kompetitieren. Es wurden wie oben beschrieben jeweils vier Transfektionsansätze ausgewertet und pro Deckglas vier Quadranten ausgezählt (Abb. 29). Es konnte weder an 10 *DIV* noch an 21 *DIV* eine Veränderung in der Anzahl der NR-1⁺ Synapsen festgestellt werden. Damit konnte kein Effekt von Sema4B oder dessen Deletionsmutanten auf die Entwicklung von Synapsen beobachtet werden.

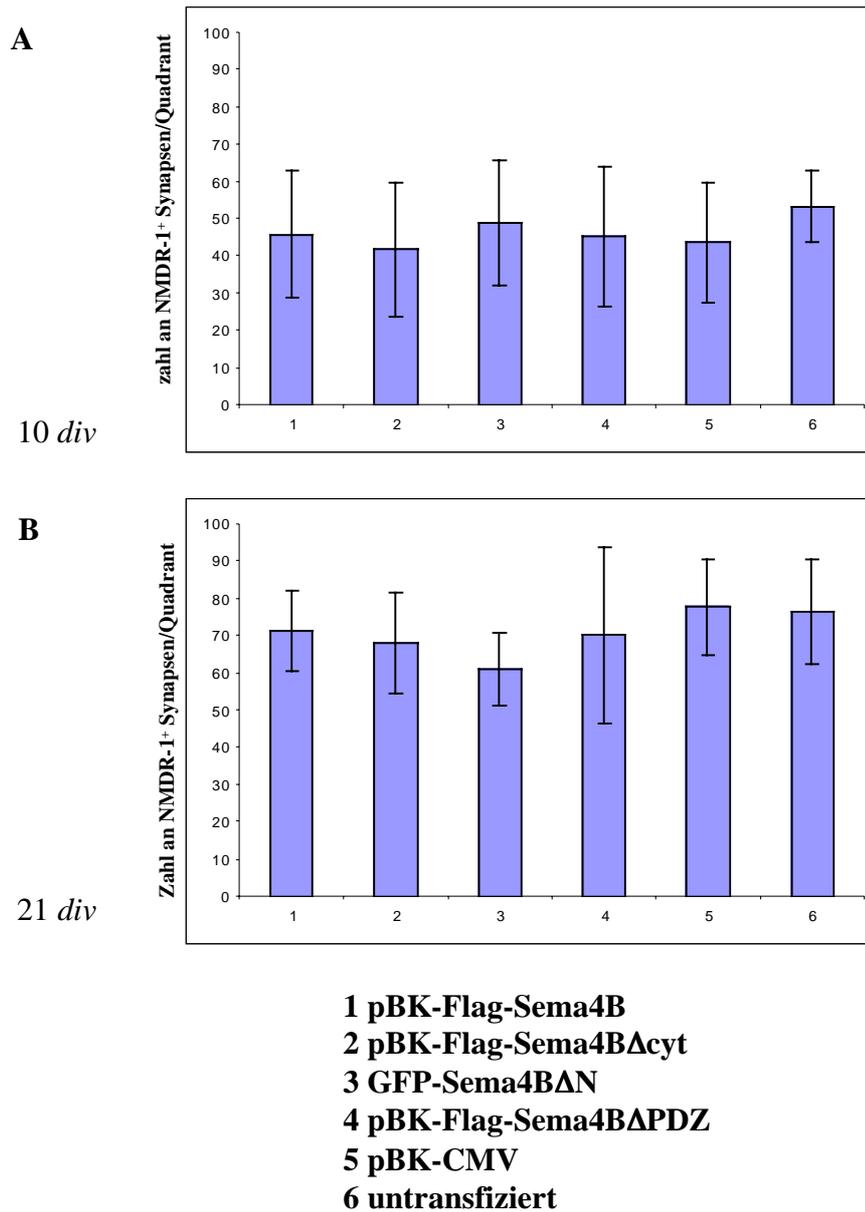


Abb. 29: Sema4B Überexpression verändert nicht die Zahl der NR-1⁺ Synapsen in primären hippocampalen Neuronen nach 10 DIV und 21 DIV. Primäre hippocampale Neuronen wurden an 3 DIV mit Expressionsvektoren für pBK-Flag-Sema4B (1), pBK-Flag-Sema4BΔcyt (2), GFP-Sema4BΔN (3), pBK-Flag-Sema4BΔPDZ (4) und pBK-CMV (5) transfiziert (n=3). Untransfizierte Zellen (6) dienen als Kontrolle. An 10 DIV (A) oder 21 DIV (B) wurden die Zellen fixiert und anhand der Antikörper α-Flag und α-NMDR-1 analysiert. Pro Transfektion wurden 4 Ansätze ausgewertet, wobei NR-1⁺ Synapsen in je vier Quadranten ausgezählt wurden. Sema4B und NR-1 kolokalisierten nach 10 DIV zu 80%, nach 21 DIV zu 83%. Hierbei gab es keine Unterschiede in der Zahl der Synapsen zwischen den verschiedenen Transfektionen untereinander und im Vergleich zu untransfizierten Kulturen. 1. AK: Maus α-Flag, Kaninchen α-NMDR-1; 2. AK.: Ziege α-Maus Alexa 488, Ziege α-Kaninchen 594.

3.3 Ansätze zur genetischen Analyse von Semaphorinen der Klasse 4

Um die physiologische Funktion von Semaphorinen der Klasse 4 näher zu analysieren, sollte als Alternative zu *in vitro*-Assays ein genetischer Ansatz verfolgt werden. Dazu sollte durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine spezifische Mutation in das Genom der Maus eingeführt werden. Zusätzlich zu *Sema4B* wurde hierfür *Sema4G* ausgewählt. Über *Sema4G* ist bis auf das Expressionsmuster wenig bekannt. Ähnlich wie *Sema4B* enthält es ein PDZ-Bindemotiv und zeigt außerdem im Gehirn ein spezifisches Expressionsmuster (Li et al, 1999). So konnten Transkripte von *Sema4g* im BO nachgewiesen werden.

3.3.1 Genomische Organisation von *Sema4B* und *Sema4G*

Um Vektoren zu generieren, die die Inaktivierung der Gene in der Maus ermöglichen, wurde zunächst die genomische Organisation von *Sema4B* und *Sema4G* untersucht. Zwei Klone, die das murine *Sema4b* enthielten, wurden aus einer genomischen Bank von 129/Sv Mäusen in einen *BAC* (*bacterial artificial chromosome*)-Vektor isoliert. Ein 6,5 kbp großes *XhoI*-Fragment konnte durch Shotgun-Klonierung und Koloniehybridisierung mit einer Probe der ersten 400 bp der *Sema4b* cDNA isoliert und mittels Sequenzierung und Restriktionsanalysen analysiert werden (Abb. 30). Dieses Fragment enthielt die Exons 1 bis 6 des Gens, die der Position 1 bis 1482 der cDNA entsprachen und für die Aminosäuren 1 bis 482 kodierte (Püschel et al., 1995). Während dieser Arbeit wurde zusätzlich die Sequenz des gesamten Gens des murinen und humanen *Sema4b* Gens durch das humane und das Maus-Genomprojekt verfügbar. Ein Vergleich der Sequenzen zeigte einige überraschende Unterschiede in der Genstruktur zwischen beiden Spezies. Nicht nur die Größen der Introns sondern auch die der Exons variierten zwischen Maus und Mensch. Während im humanen *Sema4B* Gen die Exons 1 bis 10 in einem Cluster über 14 kb zusammenliegen, ist im murinen *Sema4b* Gen eine höhere Anzahl an Exonklustern zu finden, die sich jedoch auf eine genomische Länge von 12 kb verteilen.

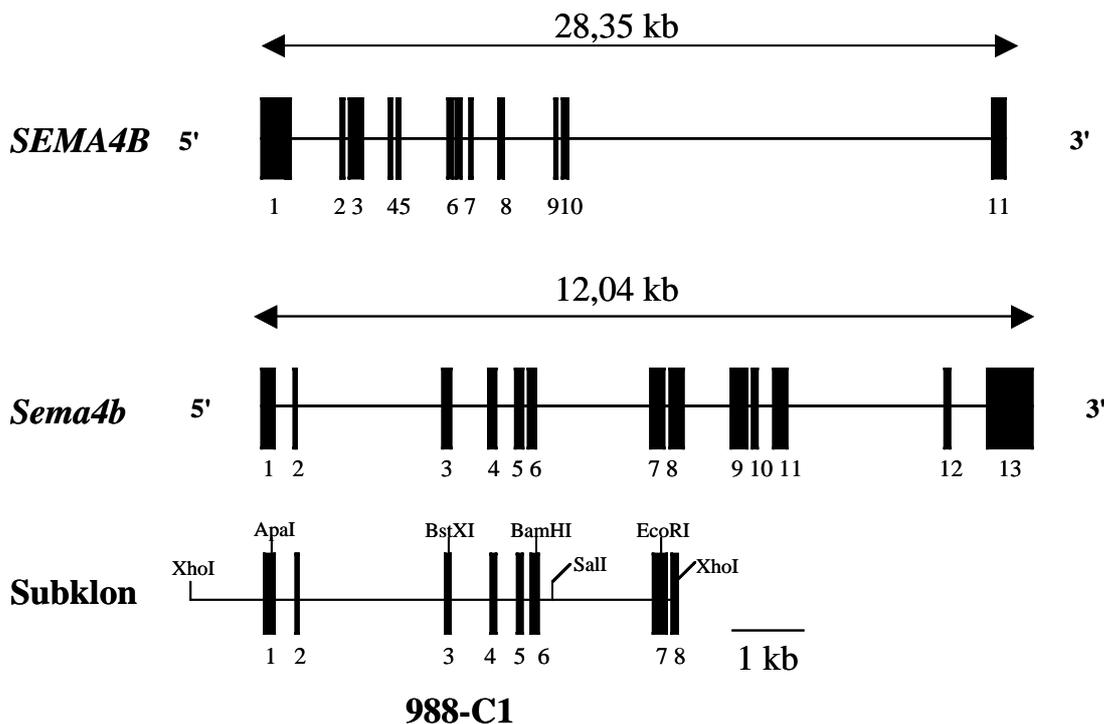


Abb. 30: Genomische Organisation des humanen und murinen *Sema4b* Locus. Die genomische Organisation des humanen *SEMA4B* und murinen *Sema4b* wurden mit Hilfe der Sequenzen des humanen und Maus-Genomprojektes ermittelt. Der Subklon 988-C1 wurde anhand eines XhoI-Verdau aus dem BAC-C1 isoliert. Restriktionsverdau, Southern Blots und Sequenzanalysen ergaben die dargestellte Restriktionskarte, die mit der Sequenz des Genomprojektes (*accession number*: X85992) übereinstimmt. Der Vergleich mit der murinen *Sema4b*-Sequenz zeigte, daß der Subklon 988-C1 Exons 1-8 beinhaltet. (Exons sind durch schwarze Balken dargestellt.)

Von Dr. Staffan Bohm (Umea University, Schweden) wurde ein Lambda FixII Phage zur Verfügung gestellt, der die genomische Sequenz von *Sema4g* enthielt. Daraus wurden durch Shotgunklonierung und Koloniehybridisierung drei Subklone im pBluescript KS+-Vektor isoliert (Abb. 31). Restriktionsanalysen und Sequenzierung zeigten, daß der Subklon 11-1 ein 5 kb großes XhoI-Fragment enthielt, das Exon 1, 2 und einen Teil von Exon 3 enthielt und den ersten 606 Basenpaaren der cDNA entsprachen, die für Aminosäuren 1 bis 202 kodieren. Subklon 19-8, war ein EcoRI-Fragment mit einer Größe von 6 kb, das die Exons 3 bis 6 (Position 614 bis 949 der cDNA, Aminosäure 204 bis 316) enthielt. Subklon 10-11 war ein SpeI-Fragment von 6,5 kb mit Exons 5 bis 13 (Position 852 bis 2040; Aminosäuren 284 bis 680). Auch hier wurden während dieser Arbeit die vollständige genomische Sequenz über Genomprojekte verfügbar. Humanes und murines *Sema4g* zeigten eine große Homologie (Exons 4 bis 12). Die Position der Exon/Intron-Grenzen war nahezu identisch.

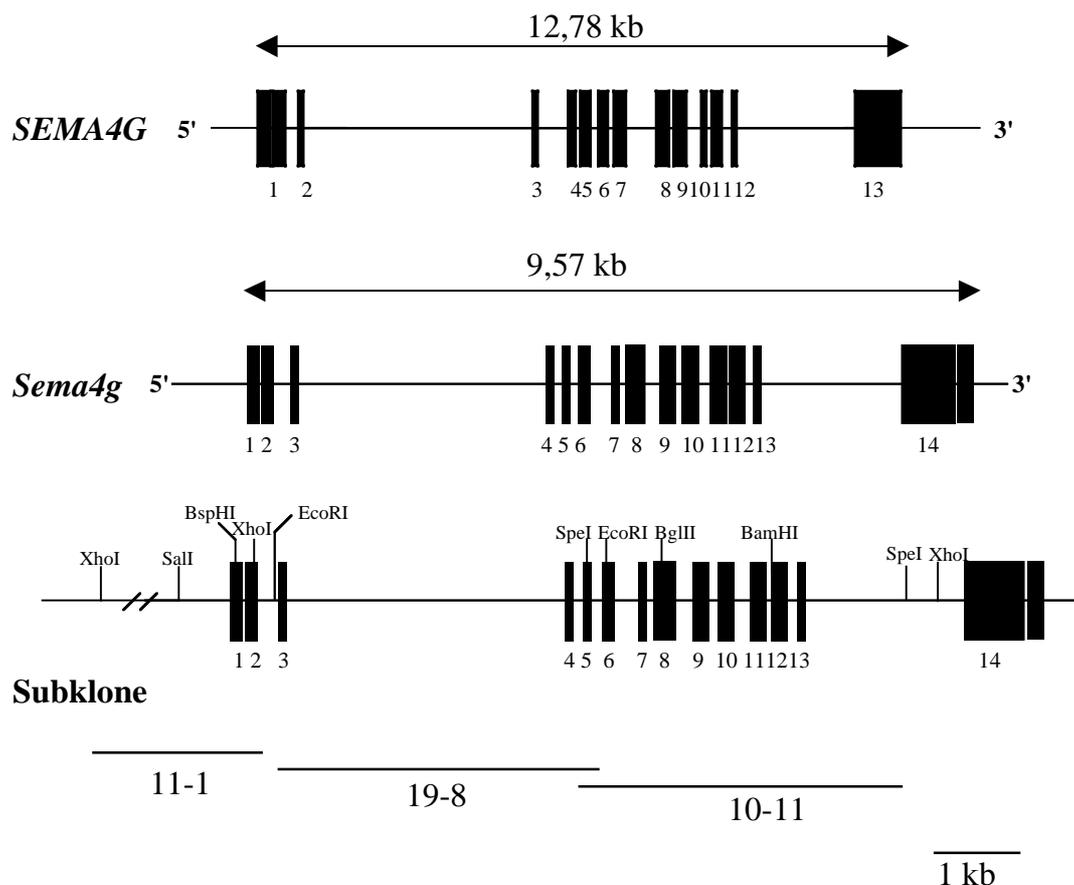


Abb. 31: Genomische Organisation des humanen und murinen *Sema4g* Locus. Die genomische Organisation des humanen *SEMA4G* und murinen *Sema4g* wurden mit Hilfe der Sequenzen des humanen und Maus-Genomprojektes ermittelt. Die Subklone 11-1 (*XhoI*-Verdau), 19-8 (*EcoRI*-Verdau) und 10-11 (*SpeI*-Verdau) wurden aus dem λ Phage II isoliert. Restriktionsverdaus, Southern Blot und Sequenzanalysen ergaben die dargestellte Restriktionskarte, die mit der Sequenz des Genomprojektes (*accession number*: NM_011976) übereinstimmt. Der Vergleich mit der Sequenz des murinen *Sema4g* zeigte, daß die Subklone Exons 1 bis 13 beinhalten. (Exons sind durch schwarze Balken dargestellt.)

3.3.2 Herstellung eines Targeting-Vektors zur Generierung von *Sema4g* Mutanten

Während dieser Arbeit konnte von der Firma Lexington Genetics eine *Sema4b* Mutante erworben werden. Daher wurde zunächst nur ein Targeting-Vektor zur Generierung von *Sema4g* Nullmutanten konstruiert. Zur Inaktivierung des *Sema4g* Gens wurde ein Vektor konstruiert, der eine Positiv/Negativ-Selektion transfizierter ES-Zellen erlaubt. Hierbei wurde als Selektionsmarker eine ACN-Kassette, die aus den zwei Transgenen, ACN-Cre und PGKneo, besteht, verwendet. Die Kassetten ACN-Cre und PGKneo werden von zwei loxP Sequenzen flankiert. Das Neomycin-Phosphotransferase Gen (PGKneo) vermittelt eine Resistenz gegen das zytotoxische Antibiotikum G418 und dient als positiver Selektionsmarker. Die ACN-Kas-

sette enthält den Promoter des murinen *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), der während der Spermatogenese die Expression von Cre aktiviert (Bunting et al., 1999). Damit kann die Cre-Rekombinase während der Spermatogenese die ACN-Kassette entfernen. Dies verhindert eine mögliche Beeinflussung des Phänotyps durch die Aktivität des Transgens (Olson et al., 1996; Colledge et al., 1995); (Abb. 32 A). Die ACN-Kassette wurde in entgegengesetzter Orientierung zur Transkriptionsrichtung von *Sema4g* kloniert. Über den Vektor pEasyFlox wurde durch die *Herpes simplex thymidin kinase* (tk) ein negativer Selektionsmarker eingeführt. ES-Zellen, die den Targeting-Vektor über nicht-homologe Rekombination integrieren, können dadurch eliminiert werden. Mit Hilfe dieser Komponenten wurde ein Targeting-Vektor generiert, der Exon 2 bis 5 von *Sema4g* durch die ACN-Kassette ersetzt. Zusätzlich wurde 5' der ACN-Kassette eine IRES-GFP-Sequenz eingeführt, die es ermöglicht, in den mutanten Mäusen die Zellen zu markieren, in denen der *Sema4g* Promoter aktiv ist. Die Verwendung eines IRES (*internal ribosomal entry site*) erlaubt einen vom *Sema4g* Startcodon unabhängigen Translationsstart (Abb. 32 B; detaillierte Beschreibung, s. Abschnitt 2.2.5, Abb. 7). Der Targeting-Vektor enthielt insgesamt 9,4 kb homologe Sequenz, welches eine homologe Rekombination mit guter Frequenz erlauben sollte (Thomas und Capecchi, 1987). Durch diesen Targeting-Vektor kommt es in dem mutanten Allel zu einem Translationsstopp nach 30 Aminosäuren. Das kurze Proteinfragment beinhaltet das Signalpeptid und ein kurzes Stück der Semaphorine-Domäne, das wahrscheinlich keine biologische Aktivität hat. Zur Analyse der korrekten Integration des Targeting-Vektors in ES-Zellen wurde eine externe Sonde (4G-3-1) für Southern Blots mittels PCR amplifiziert, die außerhalb der im Targeting-Vektor vorhandenen *Sema4g* Sequenzen liegt (,externe Probe'). Die Überprüfung der korrekten Integration in das Genom erfolgt durch einen XhoI-Verdau und Southern Blot-Analyse. Der Wildtyp *Sema4g* Locus wird dadurch als ein 8 kb XhoI-Fragment identifiziert, durch homologe Rekombination veränderte ES-Zellen zeigen durch die Deletion einer XhoI-Schnittstelle in Exon 3 ein Fragment von 13 kb.

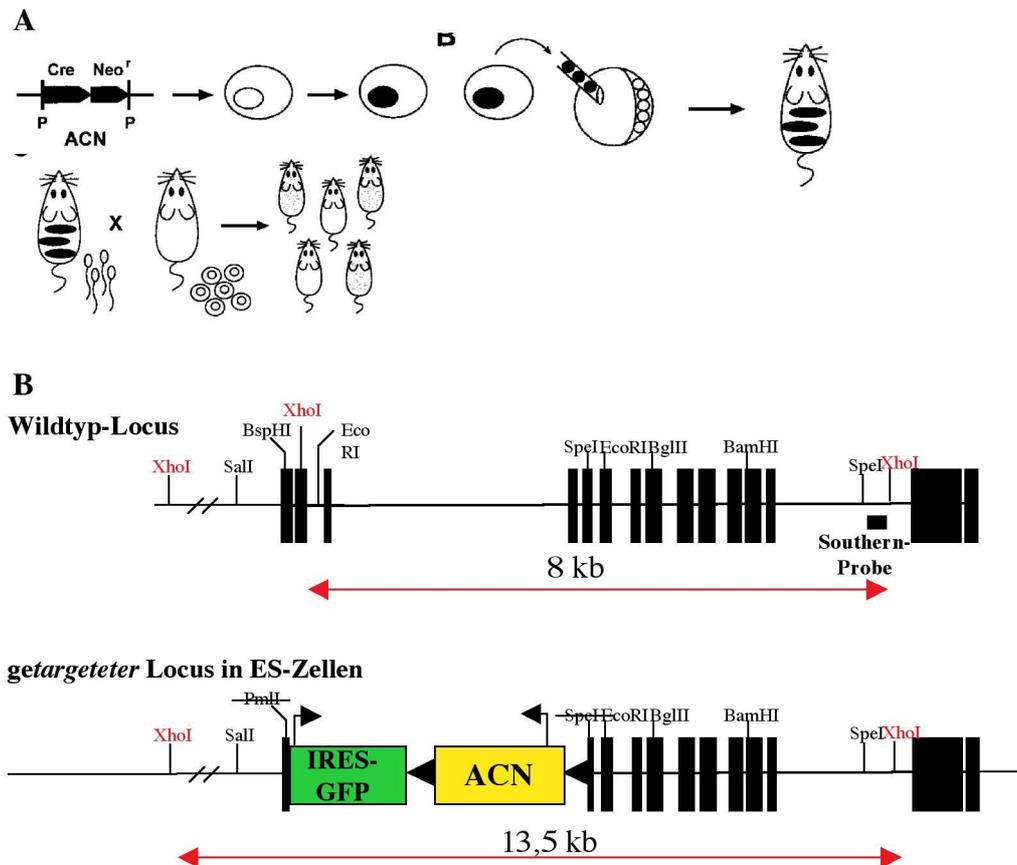


Abb. 32: Generierung des Targeting-Vektors zur Herstellung von *Sema4g* Mutanten. (A) Als Selektionsmarker wurde eine ACN-Kassette verwendet. Die Transgene ACN-Cre und PGKneo werden von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Die ACN-Kassette kontrolliert die Expression von Cre und enthält den Promotor des murinen *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), der während der Spermatogenese aktiviert wird (Bunting et al., 1999). Der Vektor wird in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingeführt, und neo-resistente ES-Zellen in Blastozysten zur Generierung chimärer Mäuse injiziert. Während der Spermatogenese männlicher Chimären wird die Cre-Rekombinase aktiviert und entfernt so die Sequenz zwischen den loxP-Sequenzen, ACN-Cre und PGKneo. (B) Schematische Darstellung des WT-Locus und des rekombinierten Locus in ES-Zellen nach homologer Rekombination des *Sema4g* Targeting-Vektors. Eine detaillierte Beschreibung der Klonierungsschritte zur Herstellung des *Sema4g* Targeting-Vektors ist in Abschnitt 2.2.5 erläutert. Alle Klonierungsschritte wurden entweder durch Sequenzierung, Restriktionsanalyse oder Koloniehybridisierung überprüft. Zur Linearisierung des Targeting-Vektors kann das Restriktionsenzym SfiI benutzt werden. Zur Analyse der korrekten Integration in ES-Zellen wurde eine externe Southern Blot-Sonde (4-G-3-1) mittels PCR amplifiziert. Zur Überprüfung der korrekten Integration in das Genom kann die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym XhoI verdaut werden. Der WT *Sema4g* Locus wird als ein 8 kb XhoI-Fragment identifiziert, durch homologe Rekombination veränderte ES-Zellen zeigen durch die Deletion einer XhoI-Restriktionsschnittstelle ein Fragment von 13 kb. P=loxP-Sequenz. Exons werden durch schwarze Balken dargestellt.

Zur Überprüfung der Hybridisierungssonde 4G-3-1 wurde genomische DNA von R1 ES-Zellen, C57BL/6 und CD1 Mäusen isoliert, mit dem Restriktionsenzym XhoI verdaut und mittels Southern Blot analysiert. Die Sensitivität einer Hybridisierungssonde ist essentiell für die späteren Analysen der durch homologe Rekombination veränderten ES-Zellen. Es konnte das erwartete WT-Fragment von 8 kb nachgewiesen werden (Abb. 33). Damit können die durch homologe Rekombination veränderten ES-Zellen in Zukunft auf die korrekte Integra-

tion des *Sema4g* Targeting-Vektors untersucht werden. Die Transfektion der ES-Zellen war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchführbar.

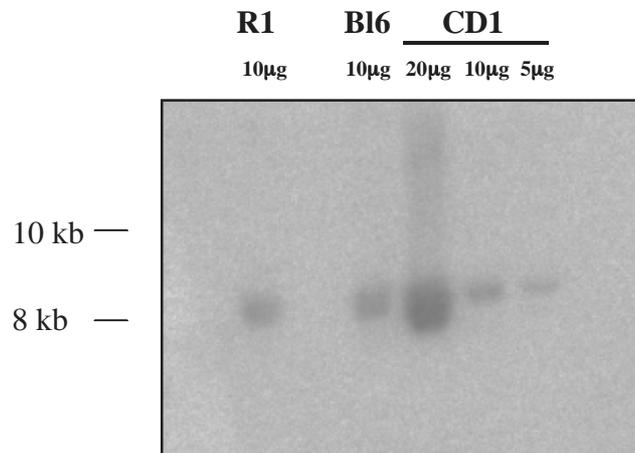


Abb. 33: Southern Blot-Analyse genomischer DNA mit der Hybridisierungssonde 4-G-3-1. Zur Überprüfung der Sonde 4-G-3-1 wurde genomische DNA von R1 Zellen, C57BL/6 Mäusen, und CD1 Mäusen isoliert und mit dem Restriktionsenzym *XhoI* über Nacht verdaut. Die DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit der [α - 32 P]-dCTP markierten Sonde 4-G-3-1 bei 64 °C hybridisiert. Die Auswertung erfolgte über den Fuji-LAS1800 Phosphoimager. Die Sonde 4-G-3-1 erkannte ein Fragment mit der erwarteten Größe von 8 kb sowohl in genomischer DNA von ES-Zellen (R1) als auch Schwanzbiopsien (BL6, CD1).

4 Diskussion

Während der Entwicklung des Nervensystems wandern Axone lange Strecken, um zu ihren Zielregionen zu gelangen. Dabei reagieren sie auf eine Vielzahl von Signalen, die permissiv, inhibierend, repulsiv oder attraktiv wirken können. Neben den Ephrinen, den Netrinen und den Slit-Proteinen wurden Mitglieder der Semaphorin-Familie als essentielle Navigationssignale für auswachsende Axone identifiziert. Die bisherigen Analysen haben sich weitgehend auf die für Axone repulsive Wirkung des sezernierten Sema3A konzentriert. Über die Funktion der anderen Mitglieder, insbesondere der membranständigen Proteine der Semaphorin-Familie ist bisher wenig bekannt. So ist unklar, ob diese Proteine auch eine Rolle bei der Steuerung der axonalen Navigation haben oder andere Funktion ausüben.

Um die Rolle von Semaphorinen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen sollte eine detaillierte Analyse des Phänotyps der *Sema3a* Mausmutante weitere Einsichten in dessen Funktion sowohl bei der Entwicklung des Nervensystems, als auch anderer Gewebe liefern. Zum anderen sollte durch einen biochemischen Ansatz die Funktion der membranständigen Semaphorine der Klasse 4 charakterisiert werden. Durch die Generierung eines Targeting-Vektors zur Mutation des Klasse 4 Semaphorin 4G sollte zusätzlich ein genetischer Ansatz für die funktionelle Analyse von membranständigen Semaphorinen verfolgt werden.

4.1 Genetische Analyse von Sema3A

Der Phänotyp einer Mutation des *Sema3a* Gens wird stark von dem genetischen Hintergrund beeinflusst. Im C57BL/6 oder 129SV Hintergrund sterben *Sema3a*^{-/-} Tiere spätestens einen Tag nach der Geburt (Taniguchi et al., 1997; Behar et al., 1996). Durch das Einkreuzen der *Sema3a* Mutation in CD1 Mäuse konnte eine Linie generiert werden, die eine geringere Letalität homozygot mutanter Tiere zeigte, und damit eine Analyse postnataler Stadien zuließ. Homozygote Mutanten waren jedoch weiterhin unterrepräsentiert. Dies läßt vermuten, daß Sema3A an wichtigen Entwicklungsprozessen beteiligt ist, die nicht durch die Aktivität anderer Semaphorine der Klasse 3 kompensiert werden können.

Der Einfluß des genetischen Hintergrunds auf den Phänotyp ist ein vielfach beobachtetes Phänomen. So ist die Mutation des EGF-Rezeptors im CD1 Hintergrund nicht letal, während die Mutation im C57BL/6 Hintergrund mit einer perinatalen Letalität verbunden ist (Montagutelli et al., 2000). Die Überlebensrate von *Sema3c*^{-/-} Mutanten im CD1 Hintergrund ist dagegen um 46% niedriger als im C57BL/6 Hintergrund (Feiner et al., 2001). Dies deutet darauf hin, daß die Allelkombinationen anderer Gene die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen.

4.1.1 **Sema3A wirkt als repulsives Signalmolekül im olfaktorischen System**

In vitro hat das sezernierte Sema3A eine starke repulsive Wirkung auf sensorische Axone (Messerschmith et al., 1995; Püschel et al., 1995). Die Analyse von *Sema3a* Mutanten zeigte jedoch keinen dieser Wirkung entsprechenden dramatischen Phänotyp. *Sema3a*^{-/-} Mäuse weisen hauptsächlich eine starke Defaszikulierung peripherer Nerven auf (Taniguchi et al., 1997). Die Defekte der axonalen Wegfindung im zentralen Nervensystem (ZNS) waren jedoch vergleichsweise gering (Behar et al., 1996; Catalano et al., 1998; Ulupinar et al., 1999). Genauere Untersuchungen zeigten jedoch auf Dendriten kortikaler Pyramidenzellen, daß Sema3A sogar eine attraktive Wirkung hat (Pouilleux et al., 1998; Pouilleux et al., 2000). Durch die Analyse des olfaktorischen Systems konnte zum ersten Mal ein repulsiver Effekt von Sema3A *in vivo* beschrieben werden. Die Projektion sensorischer Axone vom olfaktorischen Epithel (OE) zum BO ist in *Sema3a*^{-/-} Mäusen gestört. Nrp-1⁺ Axone, die normalerweise die ventrale Region des BOs vermeiden, werden in *Sema3a*^{-/-} Tieren fehlgeleitet. Die Fehlpositionierung von Nrp-1⁺ Axone führt zu einer atypischen Lokalisation von Glomeruli im BO (Schwartz et al., 2000).

Die Analysen der *Sema3a* Mutanten waren aufgrund der perinatalen Letalität bisher jedoch auf neonatale Stadien beschränkt. Die Projektion vom OE zum BO ist perinatal noch nicht vollständig entwickelt. Es blieb demnach unklar, ob die atypische Projektion von Nrp-1⁺ Axonen und die daraus resultierende Fehlpositionierung der Glomeruli ähnlich wie im peripheren Nervensystem zu einem späteren Zeitpunkt korrigiert wurde (White und Behar, 2000). Diese Frage konnte nun aufgrund der reduzierten Letalität der *Sema3a* Mutation im CD1 Hintergrund untersucht werden. An P5 ist die Nrp-1 Expression mit dem neonatalen Expressionsmuster vergleichbar und ist ebenfalls komplementär zur Verteilung der *Sema3a* mRNA. Sema3A wird im olfaktorischen System von den Zellen, die den BO umhüllen (*ensheathing cells*'), in der anteromedialen und ventralen Region des BO exprimiert (Giger et al., 1996, 1998; Pasterkamp et al., 1998; Crandall et al., 2000; Schwartz et al., 2000). Bei der Analyse von P5 *Sema3a*^{-/-} Mäusen war zu erkennen, daß Nrp-1⁺ Axone nicht auf die ventrale Region des BOs beschränkt sind, sondern sich über die gesamte ventrale Nervenschicht verteilen. Dies ist vergleichbar mit den Daten von Schwartz et al. (2000) für neugeborene Tiere. Außerdem waren Nrp-1⁺ Glomeruli im BO fehlpositioniert. Es kommt also zumindest bis P5 zu keiner Korrektur der Navigationsdefekte in *Sema3a* Mutanten. Analysen adulter Tiere werden zeigen, ob die Fehlpositionierung auch in späteren Entwicklungsstadien, wenn die Projektionen vom OE zum BO ausgereift sind, erhalten bleibt.

Die Analyse der Nrp-1⁺ Axone zeigte, daß diese im BO durch die repulsive Wirkung von

Sema3A von einer anteriomedialen und ventralen Region ausgeschlossen werden. Dadurch werden einwachsende Nrp-1⁺ Axone auf eine laterale Region des anterioren BOs bzw. auf eine mediale Region des posterioren BOs beschränkt. Sema3A Expression in der ventralen Region leitet Nrp-1⁺ Axone zusätzlich in die dorsale Region des BOs. In Abwesenheit des repulsiv wirkenden Sema3A können Nrp-1⁺ Axone in Regionen einwachsen, die sie normalerweise vermeiden und so auch ektopische Glomeruli bilden. Diese Daten zeigen, daß die Interaktion von Sema3A und Nrp-1 die räumliche Anordnung einer Gruppe von Glomeruli in der sensorische Karte des adulten BOs reguliert.

4.1.2 Sema3A beeinflusst die Projektion von OR37A⁺ Axonen im BO

Die Organisation des olfaktorischen Systems ist durch die geordnete Projektion von olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSN) vom olfaktorischen Epithel (OE) auf spezifische Glomeruli im BO charakterisiert (Ressler et al., 1993; Bulfone et al., 1998; Wang et al., 1998). OSNs der Maus exprimieren jeweils nur einen von etwa 1000 olfaktorischen Rezeptoren (OR) (Malnic et al., 1999; Buck und Axel, 1991). Alle OSNs, die den gleichen OR exprimieren, projizieren auf einen oder wenige Glomeruli, die weitgehend in verschiedenen Individuen invariante Positionen einnehmen (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994; Rodriguez et al., 1999). Die OR37-Subfamilie, mOR37A-C, konvergieren jeweils auf einen oder zwei Glomeruli der ventralen Region des BO (Strotmann et al., 2000). Nrp-1 markiert eine große Population von Axonen, die verschiedene ORs exprimieren. Um den Einfluß von Sema3A auf die Position spezifischer Glomeruli, die von Neuronen innerviert werden, die nur einen OR exprimieren, zu untersuchen, wurde die Projektion von OR37A⁺ Axone in *Sema3a* Mutanten untersucht. Im Vergleich zu WT Mäusen kam es bereits in heterozygoten *Sema3a*^{+/-} Mäusen zu subtilen Defekten in der Projektion der OR37A⁺ Axone. Die Anzahl der OR37A⁺ Glomeruli pro BO war in *Sema3a*^{+/-} Tieren geringer (im Durchschnitt 1,3 Glomeruli pro Tier) als die in WT Mäusen (2,4 Glomeruli pro BO). Der Phänotyp zeigte in diesen Tieren eine Gen-Dosis abhängige Funktion von *Sema3a*. In homozygoten *Sema3a* Mutanten konnte eine starke Verringerung der Zahl OR37A⁺ Axone im BO festgestellt werden, die auch nicht auf einen korrekt positionierten Glomerulus konvergierten.

Eine Fehlpositionierung von Glomeruli in *Sema3a* defizienten Mäusen konnte auch für Neuronen gezeigt werden, die den OR P2 exprimieren (Schwartzing, persönliche Mitteilung). P2⁺ Glomeruli sind in *Sema3a* Mutanten kleiner als in WT oder heterozygot mutanten *Sema3a* Mäusen. In neugeborenen *Sema3a*^{+/-}/*P2taulacZ* Mäusen sind zwei P2⁺ Glomeruli nachzuweisen, der eine in der lateralen Hälfte des BOs 400 µm caudal der rostralen Spitze, der andere in der medialen Hälfte bei 750 µm. Im Gegensatz hierzu war bei einigen neugeborenen *Sema3a*^{-/-} Mäusen nur ein Glomerulus auf der medialer Seite zu erkennen, die zwischen

der Position der P2 Glomeruli im WT lag. Die einwachsenden Axone waren deutlich weniger gebündelt als bei heterozygoten *Sema3a* Mutanten. *Sema3A* beeinflusst also die Positionierung von P2⁺ Glomeruli relativ zu den lateromedialen und den anterioposterioren Achsen.

Die Phänotypen der *Or37ataulacZ* und *P2tauLacZ*-Transgene in homozygoten *Sema3a* Mutanten unterscheiden sich deutlich. Während die Position von P2⁺ Glomeruli verändert ist, sind in *Sema3a*^{-/-} Mäusen keine OR37A⁺ Glomeruli mehr nachweisbar. Diese Daten zeigen, daß *Sema3A* für die korrekte Projektion von Axonen notwendig ist, wobei der spezifische Effekt wohl von der Identität des exprimierten ORs abhängt. Ähnliche Ergebnisse konnten von Mombaerts et al. für die Etablierung der topographischen Mappe, die durch die Identität der ORs definiert wird, gezeigt werden (Wang et al., 1998; Mombaerts et al., 1996). Es ist allerdings unbekannt, ob OR37A⁺ Axone auch Nrp-1⁺ sind. Aufgrund technischer Schwierigkeiten ist es bisher nicht möglich gewesen, dies durch eine Doppelfärbung mit α - β -Gal und α -Nrp-1 Antikörpern zu überprüfen. Wegen der ventralen Position der Glomeruli scheint es allerdings wahrscheinlich, daß OR37A⁺ Axone Nrp-1 negativ sind. Dies würde aber bedeuten, daß die Fehlpositionierung von OR37A⁺ Axonen auf einen indirekten Effekt von *Sema3A* zurückzuführen ist. Ein Grund dafür könnte sein, daß OR37A⁺ Axone durch fehlgeleitete Nrp-1⁺ Axone verdrängt werden. In *Sema3a*^{-/-}/*Or37ataulacZ* Mäusen könnten weniger β -Gal⁺ Axone in den BO einwandern, da sie in der ventralen Nervenschicht von fehlgeleiteten Nrp-1⁺ Axonen am Einwachsen gehindert werden und so nicht zu ihren Zielregionen projizieren können. Alternativ könnte *Sema3A* notwendig sein, um OR37A⁺, nicht aber P2⁺ Axone in den BO zu leiten, da diese möglicherweise nicht durch die Siebplatte in den BO einwachsen. Die Veränderung der Position von Glomeruli bedeutet jedoch auch, daß *Sema3A* mehr bewirkt, als Axone von einer Region auszuschließen. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte sein, daß *Sema3A* ein Bestandteil eines Koordinatensystems im BO ist. Wenn *Sema3A* als einer dieser Bestandteile wegfällt, könnte sich das ganze System verschieben, und so die Projektion von Nrp-1⁻ OR37A⁺ Axonen beeinflussen.

Ein Modell für die Wirkung von *Sema3A* ist, daß es als chemotropes Signal einen Gradienten bildet, der die Navigation von Axonen steuert. Die subtilen Defekte in *Sema3a*^{+/-}/*Or37ataulacZ* Mäusen deuten allerdings auf einen Gen-Dosis-abhängigen Effekt von *Sema3A* im olfaktorischen System hin, da im Vergleich zu WT Mäusen weniger OR37A⁺ Glomeruli nachweisbar waren. Diese Haploinsuffizienz würde bedeuten, daß die Verringerung der absoluten Konzentration von *Sema3A* zu einem Defekt führen würde. Dies spräche allerdings gegen eine chemotrope Wirkung von *Sema3A*. Falls aber die Steigung eines putativen *Sema3A*-Gradienten die Navigationsinformation vermittelt, würde die Steigung in heterozygoten *Sema3a* Mutanten verändert sein und könnte so zu einer veränderten Navigation von OR37A⁺ Axonen führen. Wie dies die Zahl der OR37A⁺ Axone beeinflusst, ist jedoch noch unklar. In *Sema3a*^{+/-} Mäusen konnten keine fehlgeleiteten Nrp-1⁺ Axone nachgewiesen werden. Dies könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, daß die Nrp-1 Antikörper Färbungen

wesentlich weniger sensitiv sind, als die Visualisierung von Axonen durch einen tauLacZ Marker.

Ein vergleichbarer Phänotyp konnte in der retinocollicularen Projektion in *Ephrin-a2* und *Ephrin-a5* Mutanten beobachtet werden (Feldheim et al., 2000). Die Ephrine wirken für retinale Axone als chemotrope Signale in der anteriorposterioren Achse des superioren Colliculus. In WT Mäusen terminieren temporale Axone, durch EphA4 und EphA2 geleitet, im anterioren Colliculus. Nasale Axone hingegen vermeiden die anteriore Region, da sie weniger sensitiv für die repulsive Wirkung der Ephrine sind und projizieren in den posterioren Colliculus. Obwohl in *Ephrin-a2/Ephrin-a5* Doppelmutanten keine nachweisbaren Eph-A Liganden mehr vorhanden sind, ist noch eine rudimentäre topographische Organisation der Projektionen nachweisbar. Retinale Axone füllen das gesamte Zielgebiet aus. Dies bedeutet, daß die retinocolliculare Projektion nicht allein durch Gradienten repulsiver Signale bestimmt wird, sondern auch durch die Konkurrenz um limitierende positive Faktoren oder Wechselwirkung zwischen Axonen. Demnach könnte analog die Fehlpositionierung von Nrp-1⁺ Axonen auch Axone beeinflussen, die nicht selber für Sema3A sensitiv sind.

4.1.3 Mögliche physiologische Funktion von Sema3A in der Organisation des olfaktorischen Systems

In Mäusen bildet die Projektion der OSN zwei symmetrisch angeordnete sensorische Karten von Glomeruli, eine im lateralen und eine im medialen BO, die sich aus der nahezu invarianten, räumlichen Verteilung der ORs ergibt (Johnson et al., 1999; Nagao et al., 2000). Dementsprechend gibt es eine laterale und mediale Terminationszone von Nrp-1⁺ Axonen, die durch eine Sema3A exprimierende Region in der ventralen Nervenschicht voneinander getrennt werden (Taniguchi et al., 2003). Sema3A könnte also als repulsives Signal an die Etablierung dieses Projektionsmusters beteiligt sein, indem es für die Trennung der beiden Terminationsdomänen sorgt.

Diese Schlußfolgerung wird auch in den von Taniguchi et al. (2003) kürzlich veröffentlichten Daten bestätigt. In *Sema3a*^{-/-} Mäusen konnte an P28 eine Fehlpositionierung von Nrp⁺ Axonen in der anteriomedialen Achse nachgewiesen werden. Auch Nrp⁻/OCAM⁺ Axone zeigten eine Fehlpositionierung. Diese Ergebnisse unterstützen ein Modell, wonach die Projektion von Nrp⁻ Axonen indirekt durch Sema3A beeinflusst werden kann. Dies hat zur Folge, daß in *Sema3a*^{-/-} Tieren die räumliche Verteilung der durch bestimmte Geruchsstoffe aktivierten Glomeruli verändert ist (Taniguchi et al., 2003). Im Unterschied zu den Ergebnissen von Schwarting et al. (unveröffentlicht) konnten Taniguchi et al. (2003) keine Veränderung der Position von P2⁺ Glomeruli in *Sema3a*^{-/-} Tieren beobachten. Dies könnte jedoch auf die unterschiedlichen genetischen Hintergründe der *Sema3a* Mäuse zurückzuführen sein: wäh-

rend die Analysen der *Sema3a* Mäusen von Taniguchi et al. (2003) im C57BL/6 Hintergrund durchgeführt wurden, war die *Sema3a* Mauslinie von Schwarting in einem gemischten C57BL/6-129/SV Hintergrund (Behar et al., 1996).

Ein weiterer Interpretationspunkt des Verhaltens der P2⁺ Axone ist, daß der Verlust von Sema3A die Aufspaltung der Projektion in zwei sensorische Karten verhindert. Auch wenn der genaue Wirkungsmechanismus noch unklar ist, zeigen diese Daten, daß Nrp-1⁺ Axone durch Sema3A zu ihren Zielregionen gelenkt werden, während Nrp-1 negative Axone durch eine Interaktion mit Nrp-1⁺ Axonen beeinflusst zu werden scheinen.

4.1.4 Die Rolle von Sema3A während der Entwicklung des Blutgefäßsystems

Genetische Analysen von Semaphorin-Rezeptoren zeigten, daß diese Proteine eine wichtige Rolle nicht nur im Nervensystem sondern auch bei der Blutgefäßentwicklung spielen (Behar et al., 1996; Marin et al., 2001; Brown et al., 2001; Neufeld et al., 2002). Nrp-1 und Nrp-2 dienen zusätzlich zu ihrer Funktion als Semaphorin-Rezeptoruntereinheit auch als Rezeptor für VEGF₁₆₅ und interagieren mit VEGFR-1 und -R2. Die Überexpression von Nrp-1 in transgenen Tieren führt zu vaskulären Defekten, wie zu einem Überschuß an Blutgefäßen im Nervensystem (Kitsukawa et al., 1997). *Nrp-1* defiziente Mäuse hingegen zeigen eine verminderte Anzahl an Blutgefäßen im ZNS und starke Defekte bei der Angiogenese während der Umstrukturierung des primären vaskulären Plexus (Kawasaki et al., 1999). Es stellte sich die Frage, ob Nrp-1 im vaskulären System nur als VEGF-Rezeptor wirkt, oder auch als Rezeptor für Sema3A, wobei es eine Repulsion von Endothelzellen vermittelt (Miao et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Rolle des Nrp-1-Liganden Sema3A im vaskulären System näher untersucht.

Nach der Bildung des primären Blutgefäßsystems durch die Expansion und Differenzierung von Angioblasten kommt es in der Angiogenese durch Umstrukturierung des primären Blutgefäßsystems zur Bildung eines hierarchisch geordnetem Musters von Verzweigungen. Dieser Prozess ist in *Sema3a*^{-/-} Embryonen in einigen Regionen deutlich gestört. Analyse der Kopfregion von E9,5 Embryonen zeigte, daß in *Sema3a*^{-/-} Embryonen der primäre Plexus zwar ausgebildet wird, jedoch die folgenden Reifungsprozesse nicht oder nur verzögert stattfinden. In der Rumpffregion war die Bildung der dorsalen Aorta in *Sema3a*^{-/-} Embryonen zu erkennen, jedoch war die anteriore Kardinalvene nicht vollständig ausgebildet. Besonders auffallend waren die Defekte in der Vaskularisierung der Somiten der Schwanzregion. Hier war in mutanten Embryonen das den intersomitischen Blutgefäßen ausgehende, fein strukturierte Netz von Blutgefäßen der Somiten nicht zu beobachten. Diese Defekte deuten auf eine

Störung der Angiogenese hin. Auch in späteren Embryonalstadien waren Veränderungen in der Blutgefäßentwicklung in *Sema3a* defizienten Embryonen nachweisbar. In E10,5 und E11,5 *Sema3a*^{-/-} Embryonen war in der Kopfreion eine geringere Komplexität des Verzweigungsmusters der Blutgefäße erkennbar. Der Phänotyp der *Sema3a* Mutanten deutet darauf hin, daß die Umstrukturierung des Blutgefäßsystems nach Bildung des primären Plexus in der Kopfreion nicht oder nur unvollständig stattfindet. Es ist unklar, ob diese Defekte auf eine verzögerte Entwicklung zurückzuführen sind oder Konsequenz der in E9,5 zu beobachtenden Defekte sind. Analyse der Kiemenbögen oder der Schwanzregion zeigte dagegen nur geringe Unterschiede zwischen homo- und heterozygoten Mutanten an E10,5 und E11,5, was vermuten läßt, daß die an E9 beobachteten Defekte in späteren Stadien korrigiert wurden.

Die beschriebenen Phänotypen könnten vermuten lassen, daß diese Tiere nicht überlebensfähig sind. Zwar sind *Sema3a*^{-/-} Tiere an P0 unterrepräsentiert, aber einige homozygote *Sema3a* Mutanten vorhanden. Die Defekte in der Angiogenese könnten während der Entwicklung korrigiert werden, zum Beispiel indem andere Mitglieder der Klasse 3 Semaphorine die Funktion von Sema3A übernehmen. Es konnte auch für andere sezernierte Semaphorine der Klasse 3 gezeigt werden, daß sie eine Rolle während der Entwicklung des Blutgefäßsystems spielen (Serini et al., Manuskript eingereicht). Die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte Anzahl an *Sema3a*^{-/-} Mäusen an P21 resultiert möglicherweise aus verbleibenden vaskulären Defekten.

Es besteht die Möglichkeit, daß die Defekte in *Sema3a*^{-/-} Embryonen nicht auf einen direkten Einfluß auf die Blutgefäßentwicklung zurückzuführen, sondern sekundärer Natur sind. Zwischen dem Nerven- und Blutgefäßsystem bestehen verschiedene Wechselwirkungen, die teilweise durch Signalmoleküle vermittelt werden, die in beiden Systemen eine Rolle spielen. So folgen in der Haut von Mäusen Arterien dem Verzweigungsmuster sensorischer Nerven. Dies wird durch eine neuronale Produktion von VEGF vermittelt (Mukouyama et al., 2002). Zusätzlich wird das Wachstum sympathischer Axone durch Artemin gesteuert, das von vaskulären glatten Muskelzellen gebildet wird (Honma et al., 2002). Es stellte sich daher die Frage, ob die Defekte der Blutgefäßentwicklung in *Sema3a*^{-/-} Embryonen eine Konsequenz axonaler Projektionsfehler sind. Jedoch wird der vaskuläre Phänotyp zu einem Zeitpunkt beobachtet, bevor die betroffenen Gewebe innerviert werden. Daher ist anzunehmen, daß der Phänotyp in *Sema3a*^{-/-} Embryonen keine Konsequenz von Defekten des Nervensystems ist.

Während der Vaskulogenese und Angiogenese spielt die Motilität und Migration von Endothelzellen eine essentielle Rolle. Dabei wird die Migration von Endothelzellen durch die Aktivierung von Integrinen z.B. durch VEGF reguliert (Kiosses et al., 2001; Martin-Bermudo et al., 1998; Byzova, 2000). In Endothelzellen kolokalisieren Sema3A und Nrp-1 mit einer speziellen Klasse von $\alpha v \beta 3$ Integrinen (Serini et al., Manuskript eingereicht). Endothelzellen, die dominant-negatives Nrp-1 oder Plexin-A1 exprimieren, zeigen, eine erhöhte Persistenz der Migration. Demnach reguliert Sema3A als autocrines Signal die Migration von Endothel-

zellen durch seine Effekte auf die Aktivität von Integrinen. Es ist jedoch nicht geklärt, ob Integrine mit diesem Komplex assoziieren. Der Phänotyp von *Sema3a* defizienten Mäusen zeigt, daß diese Regulation physiologisch relevant ist. Die Regulation der Integrin-vermittelten Adhäsion spielt auch beim Sema3A-vermittelten Kollaps des Wachstumskegels eine wichtige Rolle (Mikule et al., 2002) und könnte damit neben den Effekten auf Aktinfilamente eine generelle Reaktion auf Semaphorine sein.

4.1.5 Axonale Wegfindung und Blutgefäßentwicklung: zwei miteinander verbundene Prozesse

Sema3A ist ein weiteres Beispiel dafür, daß während der Entwicklung axonale Wegfindung und Entwicklung von Blutgefäßen von sehr ähnlichen Mechanismen gesteuert werden. Dabei spielt Nrp-1 eine zentrale Rolle. Nrp-1 kann sowohl Sema3A als auch VEGF₁₆₅ binden. Strukturelle Analysen zeigen, daß die Bindungsstelle von Sema3A und VEGF₁₆₅ überlappend sind (Gu et al., 2002), und so beide Moleküle um die Bindung an die B-Subdomäne von Nrp-1 kompetieren. Sema3A könnte also während der Entwicklung des Blutgefäßsystems über verschiedene Mechanismen wirken: Es könnte über den Nrp-1/PlexinA-1-Komplex Signalkaskaden aktivieren, die die Aktivität von Integrinen regulieren. Sema3A könnte aber auch mittels Nrp-1 auf VEGFR-1 oder -2 wirken. Dabei würde Sema3A mit VEGF₁₆₅ um die Bindung an Nrp-1 kompetieren, und dessen Wirkung auf VEGFR-1 oder -2 beeinflussen. So konnte von Bagnard et al., (2001) gezeigt werden, daß Sema3A repulsiv auf neuronale Vorläuferzellen wirkt und bei längerer Einwirkung Apoptose auslöst. Für die repulsiven Effekte ist zusätzlich zu Nrp-1 auch VEGFR-1 notwendig. Sowohl Repulsion als auch Induktion von Apoptose werden inhibiert, indem die Bindung von Sema3A an Nrp-1 von VEGF₁₆₅ blockiert und/oder ein VEGFR-1 abhängiger Signalweg aktiviert wird. Es ist vorstellbar, daß ein ähnlicher Mechanismus auch während der Angiogenese wirkt, wobei die räumlich und zeitlich regulierte Präsentation der beiden Signalmoleküle bestimmt, welcher Effekt dominiert (s. Abb. 34).

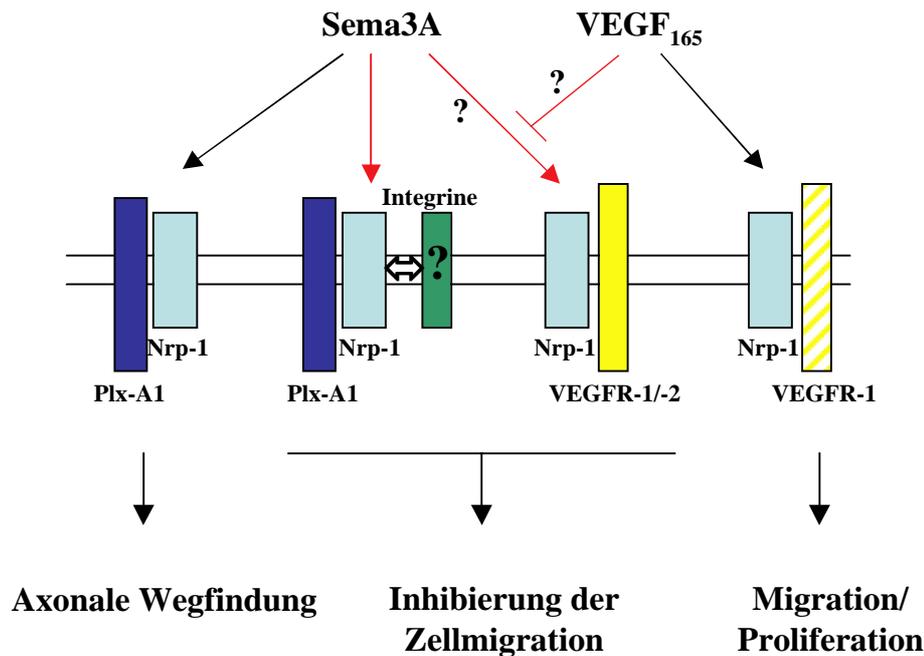


Abb. 34: Sema3A reguliert die Zellmigration und axonale Wegfindung durch Aktivierung verschiedener Rezeptorkomplexe. Schematische Darstellung verschiedener Funktionen von Sema3A. Sema3A bindet die Liganden-bindende Untereinheit Nrp-1. Über die Signal-transduzierende Untereinheit Plx-A1 wird eine Signalkaskade aktiviert, die den repulsiven Effekt auf Axone vermittelt. Sema3A kann auch die Migration von Endothelzellen regulieren, indem es die Affinität von Integrinen für seine Liganden reguliert. Dabei wirkt Sema3A über den Nrp-1/Plx-A1 Komplex, wobei ungeklärt ist, ob es zu einer direkten Interaktion mit β -Integrinen kommt. Sema3A kann auch über einen Nrp-1/VEGFR-1/-2 Komplex wirken, VEGF₁₆₅-Bindung an Nrp-1 inhibiert diesen Prozeß. Die Bindung von VEGF₁₆₅ an Nrp-1 erhöht die Affinität von VEGFR-1 für VEGF und stimuliert so die Migration von Endothelzellen. Sema3A und VEGF₁₆₅ könnten durch Konkurrenz um die Bindung an Nrp-1 die Entwicklung des Blutgefäßsystems regulieren.

Neben Sema3A spielen auch Semaphorine wie Sema3C und das membranständige Sema5A während der Entwicklung des kardiovaskulären Systems eine Rolle. Sema3C steuert die Migration von kardialen Neuralleistenzellen (Feiner et al., 2001), während Sema5A die Restrukturierung des primären vaskulären Plexus beeinflusst (Fiore und Püschel, unveröffentlicht). Damit sind die Semaphorine die zweite Proteinfamilie neben den Ephrinen, die sowohl neuronale als auch vaskuläre Entwicklungsprozesse steuern (Adams et al., 1999).

4.1.6 Ausblick

Durch die Analyse der *Sema3a* Mutante konnte ein Einblick in die physiologische Funktion von Sema3A gewonnen werden. Im olfaktorischen System beeinflusst Sema3A die Projektion von Nrp-1⁺ Axonen und wirkt als chemotropes Signal. Wenn Sema3A durch Bildung eines Gradienten wirkt, bleibt jedoch zu klären, wie dieser im BO verläuft. Dies könnte durch eine detaillierte Analyse von Nrp-1⁺ Axonen sowie der Verteilung von Nrp-1⁺ Glomeruli erfolgen. Desweiteren konnten Effekte von Sema3A auf OSN gezeigt werden, die durch die

Expression eines spezifischen ORs gekennzeichnet sind. Der Phänotyp der beiden untersuchten Transgene *Or37atauLacZ* und *P2tauLacZ* unterschied sich jedoch stark, zudem ist unklar, worauf dieser Effekt zurückzuführen ist. Zunächst müsste überprüft werden, ob OR37A⁺ Axone tatsächlich Nrp-1⁺ sind. Darüberhinaus ist auch eine genauere Analyse der Verteilung von β -Gal⁺ Glomeruli in *Sema3a*^{+/-} Tieren notwendig, um den Phänotyp in heterozygoten Tieren und damit die Art der Wirkung von Sema3A besser zu verstehen.

Nrp-1 defiziente Mäuse zeigen starke Defekte in der Blutgefäßentwicklung. Bisher wurde angenommen, daß diese alleinig durch VEGF₁₆₅ vermittelt werden. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß auch Sema3A an diesen Prozessen beteiligt ist. Es ist jedoch noch unklar, welche Signalmechanismen dieser zugrunde liegen. Zunächst müsste durch biochemische Ansätze eine mögliche Assoziation von Integrinen im Nrp-1/Plx-Komplex untersucht werden. Die durch Sema3A-aktivierte Signalkaskade ist bisher nur teilweise aufgeklärt. Daher ist es notwendig, weitere Interaktionspartner von A Typ-Plexinen in Endothelzellen zu identifizieren. Sema3A und VEGF₁₆₅ interagieren mit überlappenden Bindungsstellen in Nrp-1. Um die Funktion von Nrp-1 als Sema3A und VEGF₁₆₅-Rezeptor zu kennen, ist es letztendlich notwendig Mutanten zu erzeugen, die jeweils nur noch einen der beiden Liganden binden können.

Die Untersuchungen des olfaktorischen und vaskulären Systems in *Sema3a* Mutanten konnten neue Rückschlüsse auf die Funktion von Sema3A *in vivo* geben und beschreiben eine neue Verbindung zwischen der neuronalen und vaskulären Entwicklung, die durch Sema3A vermittelt wird.

4.2 Biochemische Analyse des membranständigen Sema4B

4.2.1 Interaktion von Klasse 4 Semaphorinen mit PDZ-Domänen Proteinen

Über die Funktion der membranständigen Semaphorine ist bisher nur wenig bekannt. Da die Expression der 7 Mitglieder der Klasse 4 Semaphorine nicht nur auf das embryonale Nervensystem begrenzt ist, ist es möglich, daß sich die Funktion dieser Proteine nicht auf die axonale Wegfindung beschränkt. Erste Hinweise auf die Funktion dieser Proteine bietet die Analyse von Sema4D, das unter anderem in der immunologischen Synapse lokalisiert und an der T-Zellaktivierung beteiligt ist. Es ist jedoch unklar, ob Sema4D als Liganden oder Rezeptoren in diesem Komplex fungiert. Einen weiteren Hinweis auf mögliche Funktionen der Klasse 4 Semaphorine liefert die Beobachtung, daß mehrere Klasse 4 Semaphorine ein C-terminales PDZ-Bindemotiv aufweisen und mit PDZ-Domänen Proteinen interagieren (Wang et al., 1999; Inagi et al., 2001; Schultze et al., 2001). PDZ-Domänen Proteine sind wesentlich an der Organisation der postsynaptischen Dichte (PSD) und der Signalübertragung durch Zelladhäsionsmoleküle beteiligt. Sie können aber auch den intrazellulären Transport von Proteine regulieren.

Um Hinweise auf eine mögliche Funktion der Semaphorine zu erhalten, wurde daher die Interaktion von Klasse 4 Semaphorinen mit PDZ-Domänen Proteine mit biochemischen und zellbiologischen Methoden näher untersucht. Durch Immunpräzipitation konnte die Bindung von mehreren Klasse 4 Semaphorine an verschiedene PDZ-Domänen Proteine nachgewiesen werden. Dazu gehörten auch mehrere Mitglieder der SAP/MAGUK-Proteinfamilie. Die PSD-95/SAP90 Unterfamilie der MAGUK-Proteine besteht aus PSD-95/SAP90, PSD-93/Chapsyn-110, SAP97/hDlg und SAP102 (Sheng und Sala, 2001). Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie enthalten neben einer SH3- und einer GK-Domäne drei PDZ-Domänen. MAGUKs sind vor allen Dingen an der Organisation von Zellverbindungen, im speziellen der PSD von exzitatorischen Synapsen, beteiligt, indem sie Membran- und zytoplasmatische Proteinen zu ‚Mikrokomplexen‘ organisieren (Fanning und Anderson, 1999). Zusätzlich wurden auch PDZ-Domänen Proteine wie GIPC-1, PTP-BL und S-Scam untersucht. Diese üben neben der Organisation von Membran-Proteinen in Synapsen auch eine Funktion beim intrazellulärem Transport, z. B. der Endozytose, und dem Recycling ihrer Interaktionspartner aus (Rongo et al., 1998). Aus der Vielzahl der Interaktionen wurde die mit PSD-95 für eine weitergehende biochemische und funktionelle Analyse ausgewählt. PSD-95 wurde zunächst als Polypeptid identifiziert, das in der PSD angereichert ist (Hunt et al., 1996), und eine zentrale Rolle bei

der Organisation von NMDA-Rezeptoren in der Synapse spielt. NMDA-Rezeptoren sind Heterotetramere, die aus zwei Arten von Untereinheiten, NR1 und NR2, aufgebaut sind. PSD-95 ist in der Lage, die Bildung von NMDA-Rezeptorklustern *in vitro* und *in vivo* zu induzieren (Kim et al., 1998; Hsueh und Sheng, 1997). Eine Interaktion mit PSD-95 konnte für drei Klasse 4 Semaphorine (Sema4B, Sema4C und Sema4G) bestätigt werden. Koexpression dieser Semaphorine mit PSD-95 in Cos-7 Zellen induzierte ähnlich wie für den NMDA-R gezeigt eine Clusterbildung. Ähnliche Ergebnisse wurde für Sema4C und Sema4F während dieser Arbeit publiziert, ohne daß allerdings funktionelle Analysen durchgeführt wurden (Wang et al., 1999; Inagi et al., 2001; Schultze et al. 2001).

Die weiteren Analysen der Interaktion mit PSD-95 konzentrierten sich in dieser Arbeit auf Sema4B. Ein gegen die zytoplasmatische Domäne von Sema4B generierter polyklonaler Antikörper ermöglichte den spezifischen Nachweis von endogenem Sema4B. Zusätzlich ergibt sich durch die Verfügbarkeit einer *Sema4b* Mausmutante die Möglichkeit, die *in vivo*-Funktion von *Sema4b* zu untersuchen. Biochemische Analysen zeigten, daß Sema4B nicht nur im embryonalen Nervensystem, sondern auch postnatal nachweisbar ist. Allerdings konnte bisher die räumliche Verteilung von Sema4B nicht immunhistochemisch charakterisiert werden. Die Bindung von Sema4B an PSD-95 konnte sowohl mit rekombinanten Proteinen als auch für die endogenen Proteinen in Membranfraktionen von Gehirnen neugeborener Mäuse verifiziert werden. Für die Interaktion sind die drei C-terminalen Aminosäuren von Sema4B essentiell. Jedoch gelang es nicht eindeutig festzustellen, welche PDZ-Domäne von PSD-95 Sema4B bindet. Es war jedoch eine Präferenz für die 2. PDZ-Domäne von PSD-95 zu erkennen. Entsprechendes wurde auch für die Bindung von Sema4C oder Sema4F an PSD-95 gezeigt (Schultze et al., 2001; Wang et al., 1999). Es ist bekannt, daß PSD-95 mit NMDA-Rezeptoren und Kalium-Kanälen mittels der PDZ-Domänen 1 und 2 interagiert (Sheng, 1996; Kim et al., 1996; Wang et al., 1999; Brenman et al., 1996; Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996). Die 3. PDZ-Domäne von PSD-95 ist in der Lage mit unterschiedlichen Signal- und Zelladhäsionsmolekülen wie Neuroligin (Irie et al., 1997), dem Mikrotubuli-assoziierten Protein CRIPT (Niethammer et al., 1998), SynGAP, einem Ras-GAP (Kim et al., 1998) oder Citron (Zhang et al., 1999) zu interagieren. Mit Sema4B konnte ein weiteres Molekül identifiziert werden, daß in der Lage ist, an PSD-95 zu binden. Es bleibt aber noch zu klären, ob Sema4B und einige der genannten Proteine gemeinsam mit PSD-95 in einem Komplex zu finden sind.

Auch für die Proteinfamilie der Ephrine konnte eine Funktion an der exzitatorischen Synapse nachgewiesen werden. Zum einem interagieren B-Ephrine direkt mit dem NMDA-R (Dalva et al., 2000), zum anderen konnte eine Interaktion mit PDZ-Domänen Proteinen an Synapsen nachgewiesen werden (Wilkinson, 2000). Die Bindung von B-Ephrin-Liganden induziert die Assoziation von B-Eph mit der NR1-Untereinheit des NMDA-R. *Ephb* Mutanten zeigen eine verminderte NMDA-R Aktivität (Henderson et al., 2001). Demnach scheinen die

Ephrine nicht die Lokalisation des NMDA-Rs an exzitatorischen Synapsen beteiligt zu sein, sondern vielmehr deren Aktivität durch eine direkte Interaktion zu beeinflussen. Desweiteren kann die Interaktion von PDZ-Domänen Proteinen mit Ephrinen und dessen Eph-Rezeptoren die Regulation der durch Ephrine induzierten Signalkaskaden beeinflussen. Bei Interaktion von Ephrinen und Ephs kann eine bidirektionelle Signaltransduktion auslösen. Dabei werden nicht nur die EphB Rezeptoren aktiviert, sondern auch der EphrinB Ligand wird an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert. Das PDZ-Domänen Protein PDZ-RGS3 interagiert mit den B-Ephrinen und vermittelt so durch Aktivierung eines G Protein-gekoppelten Rezeptors die Zellmigration von Granularzellen des Cerebellums (Lu et al., 2002). Eine Interaktion von B-Ephrinen mit der Phosphatase PTP-BL, eines oben erwähnten PDZ-Domänen Proteine, und Src Kinasen ist ein wesentlicher Bestandteil des bidirektionalen Signalmechanismus (Palmer et al., 2002). Es ist denkbar, daß die Interaktion mit PSD-95 oder anderen PDZ-Domänen Proteinen auch eine mit Sema4B gekoppelten Signalkaskade beeinflusst.

4.2.2 Funktion der Interaktion von Sema4B mit PSD-95

In hippocampalen Neuronen konnte an 21 *DIV* eine Kollokalisierung von endogenem Sema4B mit post-, jedoch nicht präsynaptischen Markern nachgewiesen werden. Während eine eindeutige Kollokalisierung von Sema4B mit PSD-95 und ProSAP-1 festzustellen war, galt dies nur zu 50-70 % für NMDR-1. Es kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, daß Sema4B auch teilweise in präsynaptischen Spezialisierungen vorhanden ist. Dies kann jedoch erst durch elektronenmikroskopische Aufnahmen schlüssig gezeigt werden. Sema4B könnte eine ähnliche Funktion wie *Drosophila* Sema1a ausüben, das unter anderem in prä- und postsynaptischen Spezialisierungen zu finden ist, wo es offenbar als Rezeptor fungiert, um die Bildung eines spezifischen Typs zentraler Synapsen zu steuern (Godenschwege et al., 2002). Sema1a wird dabei präsynaptisch als repulsives Signal zur korrekten Innervierung benötigt. Anschließend ist Sema1a jedoch ausschließlich postsynaptisch lokalisiert und wird wahrscheinlich zur Organisation der PSD benötigt. Sema1a hat auch ein putatives Typ 2 PDZ-Bindemotiv, was auf einen anderen Signalmechanismus an postsynaptischen Spezialisierungen schließen lassen könnte.

Aufgrund der bisher vorliegenden Daten ist es schwierig, die zu erwartenden Phänotypen in funktionellen Assays vorherzusagen. Es ist für Sema4B noch unklar, mit welchen Proteinen die Ektodomäne interagieren kann und ob es als Rezeptor oder als Ligand wirkt. Die Analyse eines anderen Klasse 4 Semaphorins, Sema4D/CD100, legt nahe, daß Klasse 4 Semaphorine tatsächlich die Funktion sowohl eines Liganden als auch eines Rezeptorsbestandteils ausüben könnten. Sema4D/CD100 ist auf der Oberfläche von T-Lymphozyten exprimiert, ‚Crosslinking‘ von CD100 durch einen monoklonalen Antikörper regt die Proliferation der Zellen an

(Herold et al., 1995). *Sema4d*^{-/-} Mäuse zeigen eine starke Beeinträchtigung der B-Zellentwicklung, die auf einen Defekt in der T-Zellaktivierung zurückzuführen ist. Hierbei ist der Ligand von Sema4D jedoch unbekannt (Shi et al., 2000). Die zytoplasmatische Domäne assoziiert mit einer noch unbekanntem Serin oder Threonin-Kinase (Elhabazi et al., 1997). Dies würde ebenfalls auf eine Funktion als Rezeptor hindeuten (Swiercz et al., 2002; Vikis et al., 2000). Sema4D hat aber auch eine Funktion als Ligand für Plexin-B1. Damit könnte Sema4D ähnlich wie die Ephrine als Ligand und Rezeptor fungieren. Es gibt Hinweise dafür, daß PSD-95 bereits eine essentielle Rolle bei der Synaptogenese spielt. So ist PSD-95 in Synapsen hippocampaler Neuronen früher als NMDA-R nachzuweisen (Rao et al., 1998). PSD-95 war in den hier verwendeten Kulturen wie beschrieben (Husseini et al., 2000) schon an 10 *DIV* in Synapsen nachweisbar (Daten nicht gezeigt), während Sema4B in punktförmigen Strukturen lokalisiert war, die negativ für synaptische Marker waren. Erst an 21 *DIV* war Sema4B in Synapsen angereichert. Nach Transfektion hippocampaler Neuronen kolokalisierte rekombinantes Sema4B ebenfalls erst an 21 *DIV* mit synaptischen Markern. Die späte synaptische Kolokalisation von Sema4B und PSD-95 lässt darauf schließen, daß das PDZ-Bindemotiv nicht allein den Ausschlag für die Interaktion dieser Proteine gibt. Die Interaktion kann regulatorischen Prozessen unterliegen, die durch andere PDZ-Domänen Proteine vermittelt werden könnten. Neben PSD-95 interagiert Sema4B auch mit weiteren PDZ-Domänen Proteinen, wie GIPC-1. GIPC-1 besitzt eine zentrale PDZ-Domäne, die auch mit dem für heterotrimäre GTPasen spezifischen GAP RGS-GAIP und Nrp-1 interagiert (De Vries et al., 1998; Cai und Reed, 1999). GIPC-1 wird in verschiedenen Regionen des Gehirns exprimiert, wobei es zumindest in kortikalen Neuronen ausschließlich im Zellsoma vorhanden ist (Wang et al., 1999). Da RGS-GAIP an Clathrin-Vesikeln zu finden ist, könnte es am intrazellulären Transport und der Sortierung von Proteinen beteiligt sein (Lou et al., 2002). Es ist daher vorstellbar, daß die Interaktion von Sema4B mit GIPC-1 und potentiell RGS-GAIP die Bindung von PSD-95 ausschließt, und so die Lokalisation von Sema4B in Synapsen bestimmen könnte.

Expression von Sema4B oder dessen Deletionsmutanten führte in hippocampalen Neuronen zu keinen Veränderungen in der Morphologie der Zellen oder in der Zahl an exzitatorischen Synapsen. Dies galt auch bei einer Kotransfektion von PSD-95. Diese Experimente führten weder zu einer verfrühten Bildung noch zu einer Erhöhung der Anzahl von NR-1⁺ Synapsen. Im Besonderen zeigte die Expression von rekombinanten Sema4B ohne ein PDZ-Bindemotiv keinen Einfluß auf die Stabilität der Synapsen zu haben. Es wäre vorstellbar gewesen, daß durch die fehlende Bindung von Sema4B an PSD-95 es zu einer verminderten Anzahl oder Größe der NR-1⁺ Synapsen kommen könnte. Auch zeigte die Deletionsmutante Sema4BAN, die mit endogenem Sema4B um die Bindung an PSD-95 kompetitieren sollte, keinen Effekt auf die Morphologie. Demnach scheinen potentielle Interaktionspartner der Ektodomäne von Sema4B nicht für Reifung oder Morphologie der Synapsen notwendig zu sein. Entsprechend diesen funktionellen Ergebnissen scheint die Interaktion von Sema4B und

PSD-95 nicht am Aufbau oder der Stabilisierung von Synapsen beteiligt zu sein. Allerdings bleibt die Frage offen, ob diese Interaktion Konsequenzen für die synaptische Aktivität von exzitatorischen Synapsen hat. In *PSD-95* Mausmutanten ist die Anregungsfrequenz von NMDA-abhängiger Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression verändert; es kommt zu einer Erhöhung in der Langzeitpotenzierung nach synaptischer Stimulation (Migaud et al., 1998). Diese Veränderung wird begleitet von Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens. Allerdings sind die Expression und Lokalisation des NMD-R und die Morphologie der Synapsen in *PSD-95*^{-/-} Mäusen nicht verändert. PSD-95 scheint daher eine essentielle Rolle weniger bei der Lokalisation des NMDA-Rs, sondern eher bei der Verbindung des NMDA-Rs mit Signalkaskaden der neuronalen Plastizität zu spielen. Damit ist vorstellbar, daß eine Interaktion von Sema4B mit PSD-95 in gereiften exzitatorischen Synapsen in Signalkaskaden der neuronalen Plastizität eine Rolle spielt.

4.2.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Interaktion von Sema4B und PSD-95 *in vitro* und in Kulturen primärer Neuronen nachgewiesen werden. Die Funktion dieser Interaktion ist jedoch noch unklar. Erste Ansätze einer funktionellen Analyse brachten keine klaren Aufschlüsse über die Rolle dieser Interaktion. Es bedarf einer genaueren Analyse des zeitlichen Verlaufs der Lokalisation von Sema4B und PSD-95 in primären Neuronen zwischen 10 *DIV* und 21 *DIV*. Außerdem müsste die Verteilung der einzelnen Deletionsmutanten nach Transfektion in hippocampalen Neuronen genauer beschrieben werden. Ein Ansatz, der die Funktion der Interaktion erhellen könnte, wäre die Untersuchungen von *Sema4b* defizienten primären Neuronen. Ein Funktionsverlust von Sema4B könnte durch zwei Methoden erzielt werden. Zum einen könnte endogenes Sema4B durch RNA-Interferenz suprimiert werden. Zum anderen ist inzwischen eine *Sema4b* Mausmutante verfügbar. Dabei wäre es von Interesse, die Anregungsfrequenz von NMDA-abhängiger Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression zu untersuchen. Dies würde einen Einblick in eine potentielle Funktion von Sema4B bei der neuronalen Plastizität geben. Das Einkreuzen eines in Pyramidenzellen exprimierten Thy1-YFP Transgens würde Einblick in Veränderungen der Morphologie von Pyramidenzellen geben (Feng et al., 2000). Es wäre weiterhin von Interesse, die subzelluläre Verteilung des NMDA-R in *Sema4b*^{-/-} Mäusen zu analysieren.

Neben der Interaktion von Sema4B mit PSD-95 konnte in dieser Arbeit auch ein Effekt von Sema4B auf das Zytoskelett festgestellt werden. So scheint die zytoplasmatische Domäne von Sema4B eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu induzieren, jedoch nur wenn sie durch ein Myristoylierungssignal an der Membran verankert ist. Dies könnte die Aktivierung von Sema4B in der Funktion eines Rezeptors nachahmen. Der Phänotyp des Aktin-Zytoske-

letts nach Transfektion von myr-Sema4Bcyt ähnelt dem einer Überexpression von Rho-ähnlichen GTPasen. Es ist daher denkbar, daß Sema4B direkt oder indirekt GTPasen reguliert. Sequenzanalysen der zytoplasmatischen Domäne von Sema4B zeigen jedoch keine Homologien zu anderen Proteinen, wie es z.B. für die Plexine gezeigt worden ist (Rohm et al., 2002). Daher ist es notwendig, weitere Bindungspartner von Sema4B, auch von solchen deren Bindung unabhängig vom PDZ-Bindemotiv sind, zu identifizieren.

Es konnte gezeigt werden, daß auch Sema4G mit PDZ-Domänen Proteinen interagieren kann. Durch die Generierung des *Sema4g* Targeting-Vektors ist es nun möglich nach Einführen des Vektors in embryonale Stammzellen, *Sema4g* defiziente Mäuse herzustellen und so dessen Funktion *in vivo* zu untersuchen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente stellen einen ersten Schritt dar, die Funktion membranständiger Semaphorine zu entschlüsseln. Die Identifizierung weiterer Interaktionspartner der Semaphorine der Klasse 4 und die weiterführenden Analyse der Bindung der hier untersuchten PDZ-Domänen könnte Rückschlüsse auf deren Funktion bei der Entwicklung des Nervensystems geben.

5 Zusammenfassung

Das adulte Nervensystem des Menschen ist ein hoch komplexes Netzwerk aus etwa 10^{11} Neuronen mit einer geschätzten Gesamtzahl von 10^{14} Verbindungen. Für seine Funktionsfähigkeit müssen diese Verbindungen in der Entwicklung nach einem genauen Muster geknüpft werden. Nach der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen, die das Nervensystem aufbauen, entsteht durch das gezielte Auswachsen von Axonen entlang spezifischer Routen das adulte Schaltmuster. Es wurden bisher vier Proteinfamilien identifiziert, die diese Prozesse steuern. Zu ihnen gehört auch die Proteinfamilie der Semaphorine, die als Navigationssignale für auswachsende Axone fungiert. Die Semaphorine umfassen sowohl sezernierte als auch membranständige Mitglieder und werden aufgrund ihrer Primärstruktur in 7 Klassen eingeteilt. Während die Funktion der sezernierten Semaphorine, im speziellen von Sema3A, schon relativ genau untersucht worden ist, ist die Funktion der membranständigen Semaphorine noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde durch genetische und biochemische Ansätze eine funktionelle Analyse sowohl des sezernierten Sema3A als auch des membranständigen Sema4B durchgeführt.

Das Riechsystem in Säugern wird durch die Konvergenz von sensorischen Axonen (OSNs), die jeweils einen einzelnen Geruchsrezeptor (OR) exprimieren und über weite Regionen des Riechepithels verteilt sind, auf einen oder wenige OR-spezifische Glomeruli im *Bulbus olfactorius* (BO) charakterisiert. Sema3A wird in Mäusen in der ventralen Nervenschicht des BOs exprimiert, während Axone, die die Sema3A Rezeptor-Untereinheit Nrp-1 exprimieren, in einem zur Sema3A Expressionsdomäne komplementären Muster verteilt sind. Es konnte gezeigt werden, daß Nrp-1⁺ Axone in neugeborenen *Sema3a*-defizienten Mäusen fehlgeleitet sind. Die phänotypische Analyse von *Sema3a* Mutanten war bisher auf embryonale und perinatale Stadien beschränkt, jedoch ist die Projektion vom OE zum BO perinatal noch nicht vollständig entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in P5 *Sema3a* Mutanten Nrp-1⁺ Axone defaszikuliert sind, und es zur Ausbildung von atypisch lokalisierten Nrp-1⁺ Glomeruli kommt. Durch eine transgene Mauslinie, die das Reporter-gen LacZ, fusioniert mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau, unter der Kontrolle des ORs OR37A Promoters exprimiert, konnte der Einfluß von Sema3A auf eine kleine Subpopulation von Axonen, die einen spezifischen OR exprimieren, analysiert werden. Hierbei zeigte sich, daß in *Sema3a* Mutanten weniger OR37A⁺ Axone im BO vorhanden sind und diese nicht in der Lage waren, auf ihre Zielglomeruli zu konvergieren. Darüberhinaus zeigte sich in heterozygoten *Sema3a* Mutanten ein Gen-dosis-abhängiger Effekt. Sema3A wirkt aber wahrscheinlich für olfaktorische Axone als chemotropes Signal und vermittelt die Positionsinformation für die Lokalisation der Zielglomeruli.

Nrp-1 ist darüber hinaus ein Rezeptor für VEGF und assoziiert mit VEGF-R1 und -R2,

welche die Entwicklung des Blutgefäßsystems steuern. Nrp-1 Mutanten zeigen starke Defekte in der Entwicklung des vaskulären Systems. Nach Analysen der vaskulären Struktur von *Sema3a* Mutanten konnten lokal begrenzte Defekte in Etablierung des Blutgefäßsystems festgestellt werden. Dabei wirkt Sema3A wahrscheinlich als autocrines Signal, welches die Migration von Endothelzellen durch Regulation der Aktivität von Integrinen inhibiert.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden biochemische Ansätze zur funktionellen Analyse von Klasse 4 Semaphorinen verfolgt. Einige von ihnen enthalten ein C-terminales PDZ-Bindemotiv. Neben der Bildung von *Tight Junctions* und der Signalübertragung durch Zelladhäsionsmoleküle sind PDZ-Domänen Proteine an der Organisation der postsynaptischen Dichte (PSD) beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Sema4B und PSD-95 näher untersucht. PSD-95 ist eine essentielle Komponente exzitatorischer Synapsen, die den NMDA-Rezeptor in der PSD verankert. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß Sema4B mit den PDZ-Domänen von PSD-95 *in vitro* und *in vivo* interagiert, und daß Koexpression beider Proteine zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisation von Sema4B in Cos-7 Zellen führt. Eine Kolo-kalisation von Sema4B und PSD-95 konnte an dissoziierten hippocampalen Neuronen erst nach 21 Tagen in Kultur nachgewiesen werden. Erste funktionelle Analysen in hippocampalen Neuronen konnten jedoch bisher keinen Hinweis auf eine physiologische Bedeutung dieser Interaktion geben. Überexpression von Sema4B oder verschiedener Deletionsmutanten führte zu keiner Veränderung der Morphologie oder Entwicklung synaptischer Verbindungen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente stellen einen wichtigen Schritt dar, die Funktion membranständiger Semaphorine zu entschlüsseln. Weiterführende Ansätze, wie eine Analyse von *Sema4b*-defizienten Mäusen, werden zu weiteren Erkenntnissen über die Funktion membranständiger Semaphorine bei der neuronalen Entwicklung führen.

6 Literaturverzeichnis

Adams, R.H., Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U., Klein, R. (2001): The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell*. 2001 Jan 12, 104(1):57-69.

Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W. Deutsch, U., Risau, W., Klein, R. (1999): Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*. Feb , 13(3):295-306.

Adams, R.H., Lorum, M., Klostermann, A., Betz, H., Püschel, A.W. (1997): The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J*. Oct 15, 16(20):6077-86.

Adams, R.H., Betz, H., Püschel, A.W. (1996): A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech Dev*. Jun, 57(1):33-45.

Allen, D.L., Teitelbaum, D.H., Kurachi, K. (2002): Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol*. Apr, 284(4):805-15.

Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., Yahara, I. (2001): Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci*. Apr, 4(4):367-73.

Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Menager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y., Kaibuchi, K. (2000): Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem*. Aug 4, 275(31):23973-80.

Aurandt, J., Vikis, H.G., Gutkind, J.S., Ahn, N., Guan, K.L. (2002): The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 17, 99(19):12085-90.

Bagnard, D., Chounlamountri, N., Püschel, A.W., Bolz, J. (2001): Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections. *Cereb Cortex*. Mar, 11(3):278-85.

Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S.T., Dufay, N., Lohrum, M., Püschel, A.W., Belin, M.F., Bolz, J., Thomasset, N. (2001): Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates

migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci.* May 15, 21(10):3332-41.

Bagnard, D., Thomasset, N., Lohrum, M., Püschel, A.W., Bolz, J. (2000): Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *J Neurosci.* Feb 1, 20(3):1030-5.

Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Püschel, A.W., Bolz, J. (1999): Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development.* Dec, 125(24):5043-53.

Bahri, S.M., Chia, W., Yang, X. (2001): Characterization and mutant analysis of the *Drosophila* sema 5c gene. *Dev Dyn.* Jul, 221(3):322-30.

Baldwin, H.S., Shen, H.M., Yan, H.C., DeLisser, H.M., Chung, A., Mickanin, C., Trask, T., Kirschbaum, N.E., Newmann, P.J., Albelda, S.M., and Buck, C.A. (1994): Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms, expressed during mammalian cardiovascular development. *Development.* Aug., 120(17),2539-2553.

Bamburg, J.R. (1999): Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 15:185-230.

Behar, O., Golden, J.A., Mashimo, H., Schoen, F.J., Fishman, M.C. (1996): Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature.* Oct 10, 383(6600):525-8.

Belluscio, L., Katz, L.C. (2001): Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J Neurosci.* Mar 15, 21(6):2113-22.

Boeckers, T.M., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D. (2002): ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem.* Jun, 81(5):903-10.

Boeckers, T.M., Winter, C., Smalla, K.H., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D. (1999): Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 14, 264(1):247-52.

Bradke, F., Dotti, C.G. (2000): Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol.* Oct, 10(5):574-81.

Bradke, F., Dotti, C.G. (2000): Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr Biol.* 2000 Nov 16, 10(22):1467-70.

Brenman, J.E., Christopherson, K.S., Craven, S.E., McGee, A.W., Bredt D.S. (1996): Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci.* Dec 1, 16(23):7407-15.

- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Kidd, T. (1999):** Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*. Mar 19, 96(6):795-806.
- Brown, C.B., Feiner, L., Lu, M.M., Li, J., Ma, X., Webber, A.I., Jia, L., Raper, J.A. (2001):** PlexinA2 and semaphorin signaling during cardiac neural crest development. *Development*. Aug, 128(16):3071-80.
- Bulfone, A., Wang, F., Hevner, R., Anderson, S., Cutforth, T., Chen, S., Meneses, J., Pedersen, R., Axel, R., Rubenstein, J.L. (1998):** An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron*. Dec, 21(6):1273-82.
- Bulger, M., van Doorninck, J.H., Saitoh, N., Telling, A., Farrell, C., Bender, M.A., Felsenfeld, G., Axel, R., Groudine, M., von Doorninck, J.H. (1999):** Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 27, 96(9):5129-34.
- Bunting, M., Bernstein, K.E., Greer, J.M., Capecchi, M.R., Thomas, K.R. (1999):** Targeting genes for self-excision in the germ line. *Genes Dev*. Jun 15, 13(12):1524-8.
- Byzova, T.V., Goldman, C.K., Pampori, N., Thomas, K.A., Bett, A., Shattil, S.J., Plow, E.F. (2000):** A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell*. Oct, 6(4):851-60.
- Cai, H., Reed, R.R. (1999):** Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci*. Aug 1, 19(15):6519-27.
- Carmeliet, P., Collen, D. (2000):** Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci*. May, 902:249-62.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. (1996):** Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Science*., 380:435-439.
- Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., Rougon, G. (2000):** Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signalling pathways in axonal guidance. *Neuron*. Aug, 27(2):237-49.
- Catalano, S.M., Messersmith, E.K., Goodman, C.S., Shatz, C.J., Chedotal, A. (1998):** Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Mol Cell Neurosci*. Jul, 11(4):173-82.
- 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., Soriano, E. (1998): Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development*. Nov, 125(21):4313-23.

Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chedotal, A., Tessier-Lavigne, M. (2000): Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron*. Jan, 25(1):43-56.

Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C.S., 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*. Sep, 19(3):547-59.

Chen, H. Okayama, H. (1987): High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA; *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2751.

Cheng, H.J., Bagri, A., Yaron, A., Stein, E., Pleasure, S.J., Tessier-Lavigne M. (2001): Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron*. Oct 25, 32(2):249-63.

Chess A. (2000): Odorant receptors: axon contact-mediated diversity. *Curr Biol*. Feb 24, 10(4):152-4.

Childs, S., Chen, J.N., Garrity, D.M., Fishman, M.C. (2002): Patterning of angiogenesis in the zebrafish embryo. *Development*. Feb, 129(4):973-82.

Colamarino, S.A., Tessier-Lavigne, M. (1995): The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell*. May 19, 81(4):621-9.

Colledge, W.H., Abella, B.S., Southern, K.W., Ratcliff, R., Jiang, C., Cheng, S.H., MacVinish, L.J., Anderson, J.R., Cuthbert, A.W., Evans, M.J. (1995): Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nat Genet*. Aug, 10(4):445-52.

Comeau, M.R., Johnson, R., DuBose, R.F., Petersen, M., Gearing, P., VandenBos, T., Park, L., Farrah, T., Buller, R.M., Cohen, J.I., Strockbine, L.D., Rauch, C., Spriggs, M.K. (1998): A pox-virus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity*. Apr, 8(4):473-82.

Crandall, J.E., Dibble, C., Butler, D., Pays, L., Ahmad, N., Kostek, C., Püschel, A.W., Schwarting, G.A. (2000): Patterning of olfactory sensory connections is mediated by extracellular matrix proteins in the nerve layer of the olfactory bulb. *J Neurobiol*. Dec, 45(4):195-206.

Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W., Greenberg, M.E. (2000): EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*. Dec 8, 103(6):945-56.

Dickson, B.J. (2002): Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*. Dec 6, 298(5600): 1959-64.

De Castro, F., Hu, L., Drabkin, H., Stelo, C., Chedotal, A. (1999): Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J Neurosci.* Jun, 19(11):4428-36.

De Vries, L., Elenko, E., McCaffery, J.M., Fischer, T., Hubler, L., McQuistan, T., Watson, N., Farquhar, M.G. (1998): RGS-GAIP, a GTPase-activating protein for G α heterotrimeric G proteins, is located on clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell.* May, 9(5):1123-34.

Deng, C., Capecchi, M.R. (1992): Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol.* Aug, 12(8):3365-71.

Dong, H., O'Brien, R.J., Fung, E.T., Lanahan, A.A., Worley, P.F., Huganir, R.L. (1997): GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature.* 1997 Mar 20, 386(6622):279-84.

Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., MacKinnon, R. (1996): Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell.* Jun 28, 85(7):1067-76.

Drake, C.J., Little, C.D. (1995): Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 15, 92(17):7657-61.

Driessens, M., Olivo, C., Nagata, K., Inagaki, M., Collard, J. (2002): B plexins activate Rho through PDZ-RhoGEF. *FEBS Lett.* Oct 9, 529(2-3):168.

Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Feng, D., Brown, L.F., Dvorak, A.M. (1999): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 237:97-132.

Eickholt, B.J., Mackenzie, S.L., Graham, A., Walsh, F.S., Doherty, P. (1999): Evidence for collapsin-1 functioning in the control of neural crest migration in both trunk and hindbrain regions. *Development.* May, 126(10):2181-9.

Elhabazi, A., Lang, V., Herold, C., Freeman, G.J., Bensussan, A., Boumsell, L., Bismuth, G. (1997): The human semaphorin-like leukocyte cell surface molecule CD100 associates with a serine kinase activity. *J Biol Chem.* Sep 19, 272(38):23515-20.

Fan, J., Mansfield, S.G., Redmond, T., Gordon-Weeks, P.R., Raper J.A. (1993): The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol.* May, 121(4):867-78.

Fanning, A.S., Anderson, J.M. (1999): Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol.* Aug, 11(4):432-9.

Fiore, R., Püschel, A.W. (2003): The function of semaphorins during nervous system development.

Front Biosci. May 1, 8:484-99.

Feiner, L., Webber, A.L., Brown, C.B., Lu, M.M., Jia, L., Feinstein, P., Mombaerts, P., Epstein, J.A., Raper, J.A. (2001): Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption. *Development.* Aug, 128(16):3061-70.

Feldheim, D.A., Kim, Y.I., Bergemann, A.D., Frisen, J., Barbacid, M., Flanagan, J.G. (2000): Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron.* Mar, 25(3):563-74.

Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. (2000): Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron.* Oct, 28(1):41-51.

Ferrara, N. (2000): Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.*, 55:15-35

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S, Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., Moore, M.W. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* Apr 4, 380(6573):439-42.

Firestein, S. (2001): How the olfactory system makes sense of scents. *Nature.* Sep 13, 413(6852):211-8.

Firestein, B.L., Rongo, C. (2001): DLG-1 is a MAGUK similar to SAP97 and is required for adherens junction formation. *Mol Biol Cell.* Nov, 12(11):3465-75

Flanagan, J.G., Vanderhaeghen, P. (1998): The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci.*, 21:309-45.

Fournier, A.E., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R.G., Strittmatter, S.M. (2000): Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *J Cell Biol.* Apr 17, 149(2):411-22.

Fujisawa, H., Ohta, K., Kameyama, T., Murakami, Y. (1997): Function of a cell adhesion molecule, plexin, in neuron network formation. *Dev Neurosci.*, 19(1):101-5.

Gale, N.W., Yancopoulos, G.D. (1999): Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1999 May 1, 13(9):1055-66.

Garner, C.C., Nash, J., Haganir, R.L. (2000): PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol.* Jul, 10(7):274-80.

Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.F., Anderson, D.J. (1999): Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development.

Mol Cell. Sep, 4(3):403-14.

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1999): Integrin signaling. *Science*. Aug 13; 285(5430):1028-32.

Giger, R.J., Cloutier, J.F., Sahay, A., Prinjha, R.K., Levensgood, D.V., Moore, S.E., Pickering, S., Simmons, D., Rastan, S., Wash, F.S., Kolodkin, A.I., Ginty, D.D., Geppert, M. (2000): Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron*. Jan., 25(1): 29-41.

Giger, R.J., Pasterkamp, R.J., Holtmaat, A.J., Verhaagen, J. (1998): Semaphorin III: role in neuronal development and structural plasticity. *Prog Brain Res.*, 117:133-49.

Giger, R.J., Urquhart, E.R., Gillespie, S.K., Levensgood, D.V., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L. (1998): Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron*. Nov, 21(5):1079-92.

Gilbert, S.F. (1998): Developmental Biology. *Sinauer Associated Inc. Publishers*

Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I., Lancet, D. (2001): The complete human olfactory subgenome. *Genome Res*. May, 11(5):685-702.

Goodman, C.S., Shatz, C.J. (1993): Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell*. Jan, 72:77-98.

Gordon, C.M., Mansfield, M.J. (1996): Changing needs of the patient with diabetes mellitus during the teenage years. *Curr Opin Pediatr*. Aug., 8(4):319-27

Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., Strittmatter, S.M. (1995): Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature*. Aug 10, 376(6540):509-14.

Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975): Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Biotechnology.*, 24:117-21.

Gu, C., Limberg, B.J., Whitaker, G.B., Perman, B., Leahy, D.J., Rosenbaum, J.S., Ginty, D.D., 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*. May 17, 277(20):18069-76.

Guthrie, K.M., Gall, C.M. (1995): Functional mapping of odor-activated neurons in the olfactory bulb. *Chem Senses*. Apr, 20(2):271-82.

Hall, A. (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. Jan 23, 279(5350):509-14.

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., Stevenson, B.R. (1998): ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*. Apr 6, 141(1):199-208.

- Hatten, M.E.(1999):** Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci.*, 22:511-39.
- He Z., Tessier-Lavigne, M. (1997):** Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell.* Aug 22, 90(4):739-51.
- Henderson, J.T., Georgiou, J, Jia, Z. Robertson, J., Elowe, S., Roder, J.C., Pawson, T. (2001):** The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron.*, Dec 20, 32:1041-1056.
- Herold, C., Elhabazi, A., Bismuth, G., Bensussan, A., Bomsell, L. (1996):** CD100 is associated with CD45 at the surface of human T lymphocytes. Role in T cell homotypic adhesion. *J Immunol.* Dec 15, 157(12):5262-8.
- Herold, C., Bismuth, G., Bensussan, A., Bomsell, L. (1995):** Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18mAb. *Immunol.* Jan, 7(1):1-8.
- Hirotsu, M., Ohoka, Y., Yamamoto, T., Nirasawa, H., Furuyama, T., Kogo, M., Matsuya, T., Inagaki, S. (2002):** Interaction of plexin-B1 with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 13, 297(1):32-7.
- Ho, R.K., Ball, E.E., Goodman, C.S. (1983):** Muscle pioneers: large mesodermal cells that erect a scaffold for developing muscles and motoneurons in grasshopper embryos. *Nature.* Jan 6, 301(5895):66-9.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J. (1999):** Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* Jun 18, 284(5422):1994-8.
- Holder, N., Klein, R. (1999):** Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development.* May, 126(10):2033-44.
- Honma, Y., Araki, T., Gianino, S., Bruce, A., Heuckeroth, R., Johnson, E., Milbrandt, J. (2002):** Artemin is a vascular-derived neurotrophic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron.* Jul 18, 35(2):267.
- Hsueh, Y.P., Sheng, M. (1999):** Requirement of N-terminal cysteines of PSD-95 for PSD-95 multimerization and ternary complex formation, but not for binding to potassium channel Kv1.4. *J Biol Chem.* Jan 1, 274(1):532-6.
- Hung, T.J., Kemphues, K.J. (1999):** PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development.* Jan, 126(1):127-35.
- Hunt, C.A., Schenker, L.J., Kennedy, M.B. (1996):** PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J Neurosci.* Feb 15, 16(4):1380-

8.

Husi, H., Grant, S.G. (2001): Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J Neurochem.* Apr, 77(1):281-91.

Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., Brecht, D.S.(2000): PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science.* Nov 17, 290(5495):1364-8.

Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., Sakano, H. (2001): Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes Cells.* Jan, 6(1):71-8.

Inagaki, S., Ohoka, Y., Sugimoto, H., Fujioka, S., Amazaki, M., Kurinami, H., Miyazaki, N., Tohyama, M., Furuyama, T. (1999): Sema4c, a transmembrane semaphorin, interacts with a post-synaptic density protein, PSD-95. *J Biol Chem.* 2001 Mar 23, 276(12):9174-81.

Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W., Südhof, T.C. (1997): Binding of neuroligins to PSD-95. *Science.* Sep 5, 277(5331):1511-5.

Jin, Z., Strittmatter, S.M. (1997): Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci.* Aug 15, 17(16):6256-63.

Joyner, A.L. (2000): Gene targeting, a practical approach, II edition

Johnson, B.A., Leon, M. (2000): Odorant molecular length: one aspect of the olfactory code. *J Comp Neurol.* Oct 16, 426(2):330-8.

Johnson, B.A., Woo, C.C., Hingco, E.E., Pham, K.L., Leon, M. (1999): Multidimensional chemotopic responses to n-aliphatic acid odorants in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* Jul 12, 409(4):529-48.

Kapfhammer, J.P., Raper J.A. (1987): Interactions between growth cones and neuritis from different neural tissues in culture. *J Neurosci.*, 7:1595-1600.

Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Fujisawa, H. (1999): A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development.* Nov.1, 26(21) :4895-902.

Kennedy, M.B. (1998): Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane. *Brain Res Rev.* May, 26(2-3):243-57.

Kennedy, T.E., Serafini, T., De la Torre, J.R., Tessier-Lavigne, M. (1994) : Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell.* Aug 12, 78(3):425-35.

Keshishian, H., Bentley, D. (1983): Embryogenesis of peripheral nerve pathways in grasshopper legs. III. Development without pioneer neurons. *Dev Biol.* Mar, 96(1):116-24.

- Keynes, R.J., Jaques, K.F., Cook, G.M. (1991):** Axon repulsion during peripheral nerve segmentation. *Development.*, 2:131-9.
- Keynes, R., Tannahill, D., Morgenstern, D.A., Johnson, A.R., Cook, G.M., Pini, A. (1997):** Surround repulsion of spinal sensory axons in higher vertebrate embryos. *Neuron.* Jun, 18(6): 889-97.
- Kidd, T., Bland, K.S., Goodman, C.S. (1999):** Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell.* Mar 19, 96(6):785-94.
- Kim, C.H., Chung, H.J., Lee, H.K., Huganir, R.L. (2001):** Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 25, 98(20):11725-30.
- Kim, J.H., Liao, D., Lau, L.F., Huganir, R.L. (1998):** SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron.* Apr, 20(4):683-91.
- Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y.P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A.M, Sheng, M. (1997):** GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol.* Feb 10, 136(3):669-78.
- Kim, G.J., Shatz, C.J, McConnell S.K. (1991):** Morphology of pioneer and follower growth cones in the developing cerebral cortex. *J Neurobiol.* Sep, 22(6):629-42.
- Kiosses, W.B, Hood, J, Yang, S, Gerritsen, M.E, Cheresch, D.A, Alderson, N, Schwartz, M.A. (2002):** A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. *Circ Res.* Apr 5, 90(6):697-702.
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., Fujisawa, H. (1997):** Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron.* Nov, 19(5):995-1005.
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., Fujisawa, H. (1995):** Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development.* Dec, 121(12):4309-18.
- Klostermann, A., Lorhum, M., Adams, R.H., Püschel, A.W. (1998):** The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J Biol Chem.* Mar 27, 273(13):7326-31.
- Kobayashi, H., Koppel, A.M., Luo, Y., Raper, J.A. (1997):** A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J Neurosci.* Nov 1, 17(21):8339-52.
- Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., Ginty, D.D. (1997):** Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell.* Aug 22, 90(4):753-62.
- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., Goodman, C.S. (1993):** The semaphorin genes encode a family of

transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*. Dec 31, 75(7):1389-99.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., O'Connor, T.P., Patel, N.H., Admon, A., Bentley, D., Goodman, C.S. (1992): Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron*. Nov; 9(5):831-45.

Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H. (1995): Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*. Sep 22, 269(5231):1737-40.

Koppel, A.M., Raper, J.A. (1998): Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsin activity. *J Biol Chem*. Jun 19, 273(25):15708-13.

Koppel, A.M., Feiner, L., Kobayashi, H., Raper, J.A. (1997): A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron*. Sep, 19(3):531-7.

Kreidberg, J.A., Donovan, M.J., Goldstein, S.L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R.C., Jaenisch, R. (1996): Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*. Nov, 122(11):3537-47.

Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Chng, E, Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., Kikutani, H. (2002): Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*. Oct 10, 419(6907):629-33.

Kyshe-Anderson, J. (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of protein from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 10:105-132.

Laemli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227:680-685.

Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A, Jaenisch, R., Berns, A. (1991): Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Acids Res*. Aug 11, 19(15):4293.

Lancet, D., Sadovsky, E., Seidemann, E. (1993): Probability model for molecular recognition in biological receptor repertoires: significance to the olfactory system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15, 90(8):3715-9.

Leonard, A.S., Davare, M.A, Horne, M.C., Garner, C.C., Hell, J.W. (1998): SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *J Biol Chem*. Jul 31, 273(31):19518-24.

Li, H., Wu, D.K., Sullivan, S.L. (1999): Characterization and expression of sema4g, a novel member of the semaphorin gene family. *Mech Dev*. Sep, 87(1-2):169-73.

- Lin, D.M., Wang, F., Lowe, G., Gold, G.H., Axel, R., Ngai, J., Brunet, L. (2000):** Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron*. Apr, 26(1):69-80.
- Lin, V.J. Auld, C.S. Goodman (1995):** Targeted neuronal cell ablation in the *Drosophila* embryo: pathfinding by follower growth cones in the absence of pioneers. *Neuron*., 14:707-715.
- Lin, D.M., Fetter, R.D., Kopczynski, C., Grenningloh, C., Goodman, C.S. (1994).** Genetic analysis of fascilin II in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron*., 13:1055-1069.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994):** Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. May 20, 264(5162):1145-8.
- Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S., Flanagan, J.G. (2001):** Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell*. Apr 6, 105(1):69-79.
- Lumsden, A.G., Davies, A.M. (1986):** Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. *Nature*. Oct 9-15, 323(6088):538-9.
- Luo, Y., Raible, D., Raper, J.A. (1993):** Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*. Oct 22, 75(2):217-27.
- Maestrini, E., Tamagnone, L., Longati, P., Cremona, O., Gulisano, M., Bione, S., Tamanini, F., Neel, B.G., Toniolo, D., Comoglio, P.M. (1996):** A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci. U S A* Jan 23, 93(2):674-8.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L.B. (1999):** Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*. Mar 5, 96(5):713-23.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Rubenstein, J.L. (2001):** Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science*. Aug 3, 293(5531):872-5.
- Mark, M.D, Lohrum, M, Püschel, A.W. (1997):** Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins. *Cell Tissue Res*. Nov, 290(2):299-306.
- Martin, G. (1981):** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. Dec, 78(12):7634-8.
- Martin, P., Lewis, J. (1989):** Origins of the neurovascular bundle: interactions between developing nerves and blood vessels in embryonic chick skin. *Int J Dev Biol*. Sep, 33(3):379-87.
- Martin-Bermudo, M.D., Dunin-Borkowski, O.M., Brown, N.H. (1998):** Modulation of integrin activity is vital for morphogenesis. *J Cell Biol*. May 18, 141(4):1073-81.

- McDevitt, M., Shidasani, R., Fujiwara, Y., Yang, H., & Orkin, S.A. (1997):** A 'knockdown' mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov; 94(11):6781-85.
- Messersmith, E.K., Leonardo, E.D., Shatz, C.J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., Kolodkin, A.L. (1995):** Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron*. May, 14(5):949-59.
- Miao, HQ., Soker, S., Feiner, L., Alonso, JL., Raper, JA., Klagsbrun, M. (1999):** Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol*. Jul 12, 146(1):233-42.
- Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L.C., Watabe, A.M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M.F., Morris, R.G., Morrison, J.H., O'Dell, T.J., Grant, S.G. (1998):** Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*. Dec 3, 396(6710):433-9.
- Mikule, K., Gatlin, J.C., de la Houssaye, B.A., Pfenninger, K.H. (2002):** Growth cone collapse induced by semaphorin 3A requires 12/15-lipoxygenase. *J Neurosci*. Jun 15, 22(12):4932-41.
- Ming, G., Song, H., Berninger, B., Inagaki, N., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. (1999):** Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron*. May, 23(1):139-48.
- Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., Yanagi, S.. (2002):** Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *EMBO J*. Jul 1, 21(13):3274-85.
- Mombaerts, P. (2001):** How smell develops. *Nat Neurosci*. Nov, 4:1192-8.
- Mombaerts, P. (1999):** Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*. Oct 22, 286(5440):707-11.
- Mombaerts, P. (1999):** Odorant receptor genes in humans. *Curr Opin Genet Dev*. Jun, 9(3):315-20.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., Axel, R.(1996):** Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. Nov 15, 87(4):675-86.
- Montagutelli, X., (2000):** Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol*. Nov, 11 16: 101-5.
- Morais Cabral, J.H., Petosa, C., Sutcliffe, M.J., Raza, S., Byron, O., Poy, F., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Liddington, R.C. (1996):** Crystal structure of a PDZ domain. *Nature*. Aug 15, 382(6592):649-52.
- Mori, H., Manabe, T., Watanabe, M., Satoh, Y., Suzuki, N., Toki, S., Nakamura, K., Yagi, T.,**

Kushiya, E., Takahashi, T., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (2002): Role of the carboxy-terminal region of the GluR epsilon2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron*. Sep, 21(3):571-80.

Mueller, B.K. (1999): Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci.*, 22:351-88.

Mukouyama, Y.S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M., Anderson, D.J. (2002): Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell*. Jun 14, 109(6):693-705.

Nagao, H., Yoshihara, Y., Mitsui, S., Fujisawa, H., Mori, K. (2000): Two mirror-image sensory maps with domain organization in the mouse main olfactory bulb. *Neuroreport*. Sep 11, 11(13):3023-7.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C. (1993): Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 15, 90(18):8424-8.

Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R.G., Strittmatter, S.M. (1998): Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron*. Nov; 21(5):1093-100.

Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., Herzog, Y. (2002): The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. Jan, 12(1):13-9.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z. (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. Jan, 13(1):9-22.

Niethammer, M., Kim, E., Sheng, M. (1996): Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci*. Apr 1, 16(7):2157-63.

Nobes, C.D., Hall, A.(1999): Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*. Mar 22, 144(6):1235-44.

Orioli, D., Klein, R. (1997): The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet*. Sep, 13(9):354-9.

Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K.S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U., Klein, R. (2002): EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*. Apr, 9(4):725-37.

Park, H.T., Wu, J., Rao, Y. (2002): Molecular control of neuronal migration. *Bioessays*. Sep, 24(9):821-7.

Pasterkamp, R.J., Verhaagen, J. (2001): Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Brain Res Rev.* Mar, 35(1):36-54.

Pasterkamp, R.J., Anderson, P.N., Verhaagen, J. (2001): Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur J Neurosci.* Feb, 13(3):457-71.

Pasterkamp, R.J., Giger, R.J., Baker, R.E, Hermens, W.T., Verhaagen, J. (2000): Ectopic adenoviral vector-directed expression of Sema3A in organotypic spinal cord explants inhibits growth of primary sensory afferents. *Dev Biol.* Apr 15, 220(2):129-41.

Pasterkamp, R.J., Ruitenber, M.J., Verhaagen, J. (1999): Semaphorins and their receptors in olfactory axon guidance. *Cell Mol Biol.* Sep, 45(6):763-79.

Pasterkamp, R.J., Giger, R.J., Ruitenber, M.J., Holtmaat, A.J., De Wit, J., De Winter, F., Verhaagen, J. (1999): Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci.* Feb, 13(2):143-66.

Pasterkamp, R.J., De Winter, F., Giger, R.J., Verhaagen, J. (1998): Role for semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in neuronal regeneration and scar formation? *Prog Brain Res.*, 117:151-70.

Perrot, V., Vazquez-Prado, J., 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.* Nov 8, 277(45):43115-20.

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Dodd, J., Jessell, T.M. (1990): Guidance of developing axons by diffusible chemoattractants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 55:279-89.

Polleux, F., Morrow, T., Ghosh, A. (2000): Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature.* Apr 6, 404(6778):567-73.

Polleux, F., Giger, R.J., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L., Ghosh, A. (1998): Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science.* Dec 4, 282(5395):1904-6.

Püschel, A.W. (1996): The semaphorins: a family of axonal guidance molecules? *Eur J Neurosci.* Jul, 8(7):1317-21.

Püschel, A.W., Adams, R.H., Betz, H. (1996): The sensory innervation of the mouse spinal cord may be patterned by differential expression of and differential responsiveness to semaphorins. *Mol Cell Neurosci.* May, 7(5):419-31.

Püschel, A.W., Adams, R.H., Betz, H. (1995): Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron.* May, 14(5):941-8.

- Rabacchi, S.A., Solowska, J.M., Kruk, B., Luo, Y., Raper, J.A., Baird D.H. (1999):** Collapsin-1/semaphorin-III/D is regulated developmentally in Purkinje cells and collapses pontocerebellar mossy fiber neuronal growth cones. *J Neurosci.* Jun 1, 19(11):4437-48.
- Rakic, P. (1990):** Principles of neural cell migration. *Experientia.* Sep 15, 46(9):882-91
- Rao, A., Craig, A.M. (1997):** Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron.* Oct, 19(4):801-12.
- Raper, J.A., Grunewald, E.B. (1990):** Temporal retinal growth cones collapse on contact with nasal retinal axons. *Exp Neurol.* Jul, 109(1):70-4.
- Raper, J.A., Kapfhammer, J.P. (1990):** The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron.* Jan, 4(1):21-9.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., Buck, L.B. (1993):** A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell.* May 7, 73(3):597-609.
- Ridley, A.J. (2001):** Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* Dec, 11(12):471-7.
- Risau, W. (1997):** Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* Apr 17, 386(6626):671-4.
- Risau, W., Flamme, I. (1995):** Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 11: 73-91.
- Rodriguez, I., Feinstein, P., Mombaerts, P. (1999):** Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell.* Apr 16, 97(2):199-208.
- Rohm, B., Ottemyer, A., Lohrum, M., Püschel, AW. (2000):** Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev.* May, 93(1-2):95-104.
- Rohm, B., Rahim, B., Kleiber, B., Hovatta, I., Püschel, AW (2000):** The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett.* Dec 1, 486(1):68-72.
- Rongo, C., Whitfield, C.W., Rodal, A., Kim, S.K., Kaplan, J.M. (1998):** LIN-10 is a shared component of the polarized protein localization pathways in neurons and epithelia. *Cell.* Sep 18, 94(6):751-9.
- Rossant, J., Howard, L. (2002):** Signaling pathways in vascular development. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 18:541-73.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning: a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, EE., Ten Klooster, JP., van Delft S., van der Kammen, RA., Collard, JG. (1999):** Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* Nov 29, 147(5):1009-22.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec, 74(12):5463-7.

Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W.Y., Hafner, M., MacDonald, J.F., Tymianski, M. (1999): Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*. Jun 11, 284(5421):1845-8.

Schmitt, J., Hess, H., and Stunneberg, H.G. (1993): Affinity purification of histidine tagged proteins. *Mol. Biol Rep*. Oct, 18(3) 223-230.

Schratzberger, P., Schratzberger, G., Silver, M., Curry, C., Kearney, M., Magner, M., Alroy, J., Adelman, L.S., Weinberg, D.H., Ropper, A.H., Isner, J.M. (2000): Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med*. Apr, 6(4):405-13.

Schwab, M.E, Caroni, P. (1988): Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci*. Jul, 8(7):2381-93.

Schwartz, G.A., Kostek, C., Ahmad, N. Dibble, C., Pays, L., Püschel, A.W. (2000): Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci*. Oct 15, 20(20):7691-7.

Schultze, W., Eulenburg, V., Lessmann, V., Herrmann, L., Dittmar, T., Gundelfinger, E.D., Heumann, R., Erdmann, K.S. (2001): Semaphorin4F interacts with the synapse-associated protein SAP90/PSD-95. *J Neurochem*. Aug, 78(3):482-9.

Semaphorin nomenclature committee. (1999): Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell*. May 28, 97(5):551-2

Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., Tessier-Lavigne, M. (1994): Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. Aug 12, 78(3):409-24.

Serini G., Valdembra, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zammataro, L., Primo, L., Tamagnone, L, Logan, M., Tessier-Lavigne, M., Taniguchi, M., Püschel A.W., Bussolino, F. (2003): Autocrine loops of class 3 semaphorins control endothelial motility and vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. Manuskript eingereicht.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C. (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. Jul 6, 376(6535):62-6.

Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V. Jr. (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 7, 28(5):815-20.

Sheng, M., Sala, C. (2001): PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu*

Rev Neurosci., 24:1-29.

Sheng, M., Kim, E. (1996): Ion channel associated proteins. *Curr Opin Neurobiol.* Oct, 6(5):602-8.

Shepherd, I.T., Raper, J.A. (1999): Collapsin-1/semaphorin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons. *Dev Biol.* Aug 1, 212(1):42-53.

Shima, D.T., Mailhos, C. (2000): Vascular developmental biology: getting nervous. *Curr Opin Genet Dev.* Oct, 10(5):536-42.

Shimizu, M., Murakami, Y., Suto, F., Fujisawa, H. (2000): Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J Cell Biol.* Mar 20, 148(6):1283-93.

Shin, H., Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kim, E., Sheng, M. (2000): An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J Neurosci.* May 15, 20(10):3580-7.

Skaliora, I., Singer, W., Betz, H., Püschel AW. (1998): Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. *Eur J Neurosci.* Apr, 10(4):1215-29.

Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., Kucherlapati, R.S. (1985): Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature.* Sep 19-25, 317(6034):230-4.

Song, H.J., Ming, G.L., Poo, M.M. (1997): cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature.* Jul 17, 388(6639):275-9.

Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., Poo M. (1998): Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science.* Sep 4, 281(5382):1515-8.

Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Biotechnology.*, 24:122-39.

Speidel, C.C. (1933): Studies of living nerves. II. Activities of ameboid growth cones, sheath cells, and myelin segments, as revealed by prolonged observation of individual nerve fibers in frog tadpoles. *Am J Anat.*, 52:1-79.

Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, O., Jensen, V., Paulsen, O., Andersen, P., Kim, J.J., Thompson, R.F., Sun, W., Webster, L.C., Grant, S.G., Eilers, J., Konnerth, A., Li, J., McNamara, J.O., Seeburg, P.H. (1998): Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell.* Jan 23, 92(2):279-89.

Srivastava, S., Osten, P., Vilim, F.S., Khatri, L., Inman, G., States, B., Daly, C., DeSouza, S., Abagyan, R., Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Ziff, E.B. (1998): Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. *Neuron.* Sep, 21(3):581-91.

- Stahl, B., Muller, B., von Boxberg, Y., Cox, E.C., Bonhoeffer, F. (1990):** Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron*. Nov, 5(5):735-43.
- Stein, E., Tessier-Lavigne, M. (2001):** Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science*. Mar 9, 291(5510):1928-38.
- Steup, A., Ninnemann, O., Savaskan, N.E., Nitsch, R., Püschel, A.W., Skutella, T. (1999):** Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. Feb, 11(2):729-34.
- Strotmann, J., Conzelmann, S., Beck, A., Feinstein, P., Breer, H., Mombaerts, P. (2000):** Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*. Sep 15, 20(18):6927-38.
- Strotmann, J., Hoppe, R., Conzelmann, S., Feinstein, P., Mombaerts, P., Breer, H. (1999):** Small subfamily of olfactory receptor genes: structural features, expression pattern and genomic organization. *Gene*. Aug 20, 236(2):281-91.
- Swiercz, J.M., Kuner, R., Behrens, J., Offermanns, S. (2002):** Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron*. Jul 3, 35(1):51-63.
- Takagi, S., Kasuya, Y., Shimizu, M., Matsuura, T., Tsuboi, M., Kawakami, A., Fujisawa, H. (1995):** Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol*. Jul, 170(1):207-22.
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb R.G., Fujisawa, H., Strittmater, S.M. (1999):** Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*. Oct 1, 99(1):59-69.
- Takahashi, T., Strittmater, S.M. (2001):** Plexin-A1 autoinhibition by the plexin sema domain. *Neuron*. Feb, 29(2):429-39.
- Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki, Ji J., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitsukawa, T., Fujisawa, H., Klagsbrun, M., Hori, M. (2002):** Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 19, 99(6):3657-62.
- 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., Comoglio, P. (1999):** Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*. Oct 1, 99(1):71-80.
- Tanaka, E., Sabry, J. (1995):** Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell*. Oct 20, 83(2):171-6

- Tanelian, D.L., Barry, M.A., Johnston, S.A., Le T, Smith, G.M. (1997):** Semaphorin III can repulse and inhibit adult sensory afferents in vivo. *Nat Med.* Dec, 3(12):1398-401.
- Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi, Y.K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K., Shimizu, T. (2003):** Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J Neurosci.* Feb 15, 23(4):1390-7.
- Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Missina, M., Yagi, T. (1997):** Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron.* Sep, 19(3):519-30.
- Terman, J.R., Mao, T., Pasterkamp, R.J., Yu, H.H., Kolodkin, A.L. (2002):** MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell.* Jun 28, 109(7):887-900.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. (1996):** The molecular biology of axon guidance. *Science.* Nov 15, 274(5290):1123-33.
- Theiler, K. (1989):** Atlas of embryonic development *Springer-Verlag New York Inc.*
- Thomas, K.R., Capecchi M.R. (1987):** Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* Nov 6, 51(3):503-12.
- Topinka, J.R., Brecht, D.S. (1998):** N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron.* Jan, 20(1):125-34.
- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K.H., Kampf, U., Franzer, J.T., Stumm, M., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D. (1998):** Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol.* Jul 27, 142(2):499-509.
- Tsuboi, A., Yoshihara, S., Yamazaki, N., Kasai, H., Asai-Tsuboi, H., Komatsu, M., Serizawa, S., Ishii, T., Matsuda, Y., Nagawa, F., Sakano, H. (1999):** Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *J Neurosci.* Oct 1, 19(19):8409-18.
- Ulupinar, E., Datwani, A., Behar, O., Fujisawa, H., Erzurumlu, R. (1999):** Role of semaphorin III in the developing rodent trigeminal system. *Mol Cell Neurosci.* Apr, 13(4):281-92.
- Varala-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A.W., Guthrie, S. (1997):** Motor-Axons subpopulation respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron.* Oct, 18(3):193-207.
- Vassar, R., Ngai, J., Axel, R. (1993):** Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell.* Jul 30, 74(2):309-18.
- Vikis, H.G., Li, W., He, Z., 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*. Nov 7, 97(23):12457-62.

Volpert, O.V., Tolsma, S.S., Pellerin, S., Feige, J.J., Chen, H., Mosher, D.F., Bouck, N. (1995): Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 5, 217(1):326-32.

Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., Axel, R. (1998): Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*. Apr 3;93(1):47-60.

Wang, H.U., Chen, Z.F., Anderson, D.J. (1998): Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*. May 29, 93(5):741-53.

Wang, L.H., Kalb, R.G., Strittmatter, S.M. (1999): A PDZ protein regulates the distribution of the transmembrane semaphorin, M-SemF. *J Biol Chem*. May 14, 274(20):14137-46.

Wang, L.H. & Strittmatter, S.M. (1997): Brain CRMP forms heterotetramers similar to liver dihydropyrimidinase. *J Neurochem.*, 69:2261-2269.

Wang, S.S., Tsai, R.Y., Reed, R.R. (1997): The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *J Neurosci*. Jun 1, 17(11):4149-58.

Weiner, O.D. (2002): Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr Opin Cell Biol*. Apr, 14(2):196-202.

Wilkinson, D.G. (2000): Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol.*, 196:177-244.

Winberg, M.L., Noordermeer, J.N., Tamagnone, L., Comoglio, P.M., Spriggs, M.K., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. (1998): Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell*. Dec 23, 95(7):903-16.

White, F.A., Behar, O. (2000): The development and subsequent elimination of aberrant peripheral axon projections in Semaphorin3A null mutant mice. *Dev Biol*. Sep 1, 225(1):79-86.

Wong, K., Park, H.T., Wu, J.Y., Rao, Y. (2002): Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev*. Oct, 12(5):583-91.

Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J.Y., Rao, Y. (1999): Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*. Jul 22, 400(6742):331-6.

Xia, J., Zhang, X., Staudinger, J., Huganir, R.L.(1999): Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron*. Jan, 22(1):179-87.

- Yamada, Y., Takakura, N., Yasue, H., Ogawa, H., Fujisawa, H., Suda, T. (2001):** Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood*. Mar 15, 97(6):1671-8.
- Yancopoulos, G.D., Davism, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. (2000):** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. Sep 14, 407(6801):242-8.
- Zanata, S.M., Hovatta, I., Rohm, B., Püschel, A.W. (2002):** Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J Neurosci*. 2002 Jan 15, 22(2):471-7.
- Zhao, H., Reed, R.R. (2001):** X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell*. Mar 9, 104(5):651-60.
- Zhang, W., Vazquez, L., Apperson, M., Kennedy, M.B. (1999):** Citron binds to PSD-95 at glutamatergic synapses on inhibitory neurons in the hippocampus. *J Neurosci*. Jan 1, 19(1):96-108.
- Zheng, C., Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Mombaerts, P. (2000):** Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron*. Apr, 26(1):81-91.
- Zou, Y., Stoeckli, E., Chen, H., Tessier-Lavigne, M. (2000):** Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell*. Aug 4, 102(3): 363-75.
- Zou, Z., Horowitz, L.F., Montmayeur, J.P., Snapper, S., Buck, L.B. (2001):** Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature*. Nov 8, 414(6860):173-9.

7 Anhang

Hiermit versichere ich, daß ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Münster, den 28.04.2003

Hiermit versichere ich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegt habe.

Münster, den 28.04.2003

Lebenslauf

Name: Constanze Burkhardt
Anschrift: Hammer Str. 84, 48153 Münster
Geburtsdatum/-ort: 29.10.1973/ Leverkusen
Familienstand: ledig
Name des Vaters: Dr. Tilo Burkhardt
Name der Mutter: Barbara Burkhardt, geb. Engfer

Schulbildung:

1980-1984: Grundschule Hand/ Paffrath. Bergisch Gladbach
1984-1990: Gymnasium Wermelskirchen
1990-1992: Shawnee Mission East Highschool, Prairie Village, Kansas, USA
1991-1992: Johnson County Community College, Overland Park, Kansas, USA
1992-1993: Colorado College, Colorado Springs, Colorado, USA
Mai 1993: Anerkennung der Allgemeinen Hochschulreife durch den
Regierungspräsidenten NRW (Gesamtnote: 1,5)

Studium:

WS 1993-SS 1999: Studium der Biologie (Diplom) an der Universität zu Köln
03/1996: Vordiplom
03/1998- 03/1999: Diplomarbeit in der Abt. Immunologie unter der Anleitung von Prof.
Dr. K. Rajewsky am Institut für Genetik, Universität Köln

Promotionsstudiengang:

Seit 01.04.2002: Promotionsstudiengang Biologie an der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Prüfungen:

30. 03.1999: Diplom-Prüfung im Fach Biologie in den Fächern Genetik, Biochemie
und organische Chemie

Tätigkeiten:

- 03/1998-03/1999: Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik, Köln, bei Prof. Dr. K. Rajewsky
- 05/1999-06/2003: Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. Andreas Püschel am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt, und Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Münster

Promotion:

- Seit Mai 1999: Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Abt. Molekulare Neurogenetik, Frankfurt (Mai 1999-Juli 2001). Fortsetzung der Promotion am Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster (ab Juli 2001). Die Anfertigung der Dissertation erfolgte in beiden Instituten unter der Anleitung von Prof. Dr. A. W. Püschel
- September 2002: Forschungsaufenthalt am Shriver Center, University of Massachusetts Medical School, Waltham, USA, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Schwarting.

Danksagungen

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Andreas Püschel, nicht nur allein für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können, sondern für seine kritischen Diskussionen, sein starkes Maß an Vertrauen, die Möglichkeit zur kreativen Freiheit und nicht zuletzt die aufwendige Korrektur dieser Arbeit. Die Möglichkeit, ein Labor mit aufzubauen zu können, war eine lehrreiche Erfahrung, die mir viele Wege geöffnet, aber auch viele wichtige Grenzen gezeigt hat. Seine Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Projekte beigetragen.

Prof. Dr. Christian Klämbt danke ich für das Interesse an der Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachters.

Bei Prof. Dr. Walter Stöcker bedanke ich mich für die Übernahme des Drittgutachters.

Prof. Dr. Heinrich Betz danke ich, daß er es mir ermöglicht hat, zwei Jahre in seiner Abteilung Neurochemie am MPI für Hirnforschung arbeiten zu können, und darüberhinaus, daß er unseren Mäusen ein weiteres Jahr Asyl gegeben hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerald Schwarting bedanken, der mir die einmalige Möglichkeit gegeben hat, für einige Wochen in seinem Labor am Shriver Center mitarbeiten zu können. Seine Offenheit, Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen haben mir immens geholfen. Gleichzeitig möchte ich auch Denitza Raitcheva und Dr. Jim Crandall danken, die mich zum einem sehr herzlich aufgenommen haben, und zum anderen mir die so wertvollen Kniffe und Tricks gezeigt haben.

Den Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die generöse Unterstützung meines Aufenthalts in Waltham.

Ein ganz besonderes ‚Danke‘ geht an Achim Hermann, mit dem ich nicht nur in dieser Arbeit ein Stück weitergegangen bin. Seine Offenheit, seine Kraft, seine Hilfe, aber vor allen Dingen seine Liebe haben mir immer den Weg nach vorne gezeigt.

Beate Rohm danke ich für ihre freundschaftliche Unterstützung während dieser Arbeit, für ihre Ratschläge und Diskussionen, die meinen Horizont in vieler Hinsicht erweitert haben, sowie für die beste Kickerpartnerin, die ich mir vorstellen kann.

Roberto Fiore danke ich für so viele Sachen. Vor allen Dingen dafür, daß er es immer wieder geschafft hat, mich zu motivieren. Neben den wissenschaftlichen Herausforderungen, denen er mich tagtäglich gestellt hat, und vielen ‚fast cigarettes, die häufig in wilden Diskussion endeten, waren es sein Optimismus und seine Freundschaft, die mir während dieser Arbeit sehr geholfen haben. Danke!!

Weiterhin danke ich all meinen Frankfurtern und Münsteranern Laborkollegen, besonders:

Silke Fuchs, die immer da war, mir das Sequenzieren beigebracht hat und die mir gezeigt, was Selbstverständlichkeit in einer Freundschaft bedeutet.

Billy Rahim, die eine feste Säule in unserem Labor war und uns allen zu recht den Hintern versohlt hat, wenn wir mal wieder ein Chaos hinterlassen haben.

Angelika Ottemeyer, Iris Hovatta und Silvio Zanata, die restlichen 208er, die dafür gesorgt haben, daß der Laboralltag nicht nur Alltag war.

Brigitte Anliker, Jörg Birkenfeld und Klaus Hirzel, mit denen ich eine Freundschaft verbinde, die weit über das Labor hinaus geht.

Volker Eulenburg, Koji Ono und Jesus Gomeza, die mir Labor-Asyl während meinen Frankfurt-Besuchen gewährt haben und ehrliches Interesse an mir und meiner Arbeit gezeigt haben.

Frau Kiefert, die häufig zwischen den Stühlen war, aber mir in vielen Dingen, vor allen bei dem Umzug der Tiere und bürokratischen Sachen geholfen hat.

Silke Zeißler, ‚Herr Brettschneider‘ und ‚Herr Siegert‘, die sich um mich und die Tiere gekümmert haben.

Dagmar Magalei und Bertram Schmitt, die eine konstante Größe darstellen und ohne die viele Dinge so viel schwieriger wären.

Petra Kroll, Marita Gattung und Suk-I Frisch-Lee, die den Mäusen in Münster schnell Herr geworden sind und mit denen der morgendliche Kaffee noch viel mehr Spaß machte.

Maria Wenning, Gisela Pott, Gitta Neufang, Karin Frebel, Ruth von Laer, Anja Badde, Claudia Hömme, Barbara Probst, Jens Schwamborn und Yianghua Li, die dafür gesorgt haben, daß Schwung in die Labore in Münster gekommen ist und deren Hilfestellungen mir besonders in den letzten Monaten geholfen haben.

Anja Badde und Ruth von Laer, ‚meinen‘ ersten Diplomandinnen, mit denen ich viele neue Aspekte in den Projekten entdeckt habe, die meine Launen, besonders am Ende der Arbeit, ertragen mussten, aber mit denen durch das freundschaftliche Verhältnis mein Leben um vieles bereichert wurde.

Barbara Probst, Claudia Hömme und Achim Hermann, die mir besonders in der letzten Phase der Arbeit mit Korrekturlesen, formatieren und und und geholfen haben.

Anja Minhorst danke ich für die ganze letzten Jahre, die wir für einander da waren. Ihre Unterstützung vor allen Dingen aber ihre Offenheit und ihre Geduld haben mich während dieser ganzen Jahre begleitet.

Barbara und Tilo Burkhardt möchte ich zuletzt ganz herzlich für ihre elterliche Unterstützung, ihren Zuspruch und ihr Interesse danken und will ihnen mit einer Antwort auf die Frage: ‚Wie geht es denn den Mäusen nun?‘ nicht schuldig geblieben sein...

Danke!