

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Apotheker Peter Vodrazka
aus: Grünstadt

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Thema

Der Einfluss des Sema4D-Plexin-B-Signalkomplexes auf die
Entwicklung hippocampaler Neurone

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland
Prof. Dr. Rohini Kuner

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | V |
| ZUSAMMENFASSUNG | VII |
| SUMMARY..... | VIII |
| 1. EINLEITUNG | 9 |
| 1.1. Semaphorine | 9 |
| 1.2. Semaphorinrezeptoren..... | 10 |
| 1.2.1. Neuropiline | 10 |
| 1.2.2. Plexine | 11 |
| 1.2.3. Weitere Semaphorinrezeptoren..... | 12 |
| 1.3. Semaphorin/ Plexin Funktionen..... | 13 |
| 1.3.1. Entwicklung des Nervensystems..... | 13 |
| 1.3.2. Regeneration des Nervensystems..... | 14 |
| 1.3.3. Entwicklung des kardiovaskulären Systems | 14 |
| 1.3.4. Regulation des Immunsystem | 15 |
| 1.3.5. Assoziierte Krankheiten | 16 |
| 1.4. Semaphorin 4D | 17 |
| 1.5. B-Plexine | 18 |
| 1.5.1. Korezeptoren..... | 19 |
| 1.5.2. Signaltransduktion | 19 |
| 1.6. Aufbau und Struktur des Hippocampus | 23 |
| 1.7. Die axonale und dendritische Entwicklung hippocampaler Neurone und zugrunde liegende Signalmechanismen | 25 |
| 1.7.1. Entstehung von Neuriten..... | 25 |
| 1.7.2. Neuronale Polarisaton..... | 25 |
| 1.7.3. Axonale Entwicklung..... | 26 |
| 1.7.4. Dendritische Entwicklung..... | 27 |
| 1.7.5. Ausbildung von Synapsen und Spines | 29 |
| 1.8. Ziel der Studie..... | 30 |
| 2. MATERIAL | 31 |
| 2.1. Chemikalien und Reagenzien | 31 |
| 2.2. Antikörper..... | 33 |
| 2.3. Inhibitoren und Wachstumsfaktoren | 34 |
| 2.4. DNS- und Proteinmarker | 34 |
| 2.5. Reagenziensysteme und Kits | 35 |
| 2.6. Plasmide und Vektoren..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7. Bakterienstämme und Zelllinien | 35 |
| 2.8. Verwendete Ratten- und Mauslinien | 36 |
| 2.9. Oligonukleotide | 36 |
| 2.9.1. Primer für Genotypisierungen..... | 36 |
| 2.9.2. Primer für <i>in-situ</i> -Hybridisierungen..... | 37 |
| 2.10. Enzyme | 37 |
| 2.11. Filter und Membranen | 37 |
| 2.12. Zubehör für die PDS1000 Genkanone | 37 |
| 2.13. Pufferansätze und Lösungen | 38 |
| 2.14. Medien für Bakterienkultur | 42 |
| 2.15. Medien für Zellkultur | 43 |
| 3. METHODEN | 45 |
| 3.1. Sterilisation von Lösungen und Glasware | 45 |
| 3.2. Zellkultur | 45 |
| 3.2.1. HEK-Zellen..... | 45 |
| 3.2.2. Sema4D-exprimierende Lec3.2.8.1 CHO Zelllinie..... | 45 |
| 3.2.3. Primärkultur embryonaler hippocampaler Neurone..... | 45 |
| 3.2.4. Organotypische hippocampale Kulturen..... | 46 |
| 3.3. Applikation von Sema4D, Inhibitoren und Viren | 46 |
| 3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 46 |
| 3.5. Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode | 47 |
| 3.6. Transformation | 47 |
| 3.7. Restriktionsverdau von DNS | 47 |
| 3.8. Extraktion und Aufreinigung von DNS | 48 |
| 3.8.1. Aufreinigung genomischer DNS aus Gewebe..... | 48 |
| 3.8.2. Minipräparation..... | 48 |
| 3.8.3. Maxipräparation..... | 49 |
| 3.9. Polymerasekettenreaktion | 49 |
| 3.10. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS | 50 |
| 3.11. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen | 50 |
| 3.12. Konzentrations- und Aktivitätsbestimmungen von Proteinen | 51 |
| 3.12.1. Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmung über Alkaline-Phosphatase-Aktivität..... | 51 |
| 3.12.2. Coomassie-Färbung von Proteingelen..... | 52 |
| 3.12.3. Silberfärbung von Proteingelen..... | 52 |
| 3.12.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode..... | 52 |
| 3.12.5. Bestimmung der Proteinfunktionalität über RhoA-Aktivierung..... | 52 |
| 3.13. Aufkonzentrierung von Proteinen aus Zellüberständen | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 3.14. Proteinpurifizierung..... | 54 |
| 3.15. Proteinextraktion aus HEK-Zellen | 54 |
| 3.16. Proteinextraktion aus Neuronen | 54 |
| 3.17. Western Blot | 55 |
| 3.18. Immunhistochemische Färbungen..... | 55 |
| 3.19. Immunzytochemische Färbungen..... | 56 |
| 3.20. Bindungsstudie an hippocampalen Neuronen | 56 |
| 3.21. DiI-Färbung hippocampaler Schnitte mit einer Genkanone..... | 57 |
| 3.22. <i>In-situ</i>-Hybridisierung | 57 |
| 3.23. Lac-Z Färbung..... | 58 |
| 3.24. Video-Mikroskopie..... | 58 |
| 3.25. Analyse und Quantifizierung der Morphologie von hippocampalen Neuronen | 59 |
| 3.25.1. Analyse von Axonen und Dendriten dissoziierter Neurone | 59 |
| 3.25.2. Quantifizierung von Synapsen dissoziierter Neurone | 59 |
| 3.25.3. Rekonstruktion und Analyse der Verzweigungen von Neuronen aus hippocampalen Schnitten. | 59 |
| 3.25.4. Datenanalyse und Statistik | 60 |
| 4. ERGEBNISSE | 61 |
| 4.1. Expressionsanalyse von Sema4D und Plexin-B1 im Hippocampus | 61 |
| 4.2. Herstellung und Validierung von rekombinantem Sema4D..... | 63 |
| 4.2.1. Dimerisierung und Stabilität | 63 |
| 4.2.2. Konzentrations- und Aktivitätsbestimmungen | 65 |
| 4.2.3. Bindung von rekombinantem Sema4D an hippocampale Neurone..... | 65 |
| 4.2.4. Funktionalitätsbestimmung | 66 |
| 4.3. Sema4D-vermittelte Effekte auf die Morphologie sich entwickelnder dissoziierter hippocampaler Neurone | 67 |
| 4.3.1. Einfluss von Sema4D auf die Entwicklung von Axonen und Dendriten | 67 |
| 4.3.2. Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit des Sema4D-vermittelten Effekts | 68 |
| 4.3.3. Mechanismen der Sema4D-induzierten axonalen Verzweigung..... | 69 |
| 4.3.4. Mechanismen der Sema4D-induzierten dendritischen Verzweigung | 71 |
| 4.4. Untersuchung der Signalwege der Sema4D-vermittelten Effekte..... | 72 |
| 4.4.1. Plexin-B1 und Sema4D-induzierte Effekte in hippocampalen Neuronen | 72 |
| 4.4.2. Interaktionspartner der Sema4D-Plexin-B1-vermittelten Effekte | 73 |
| 4.4.3. Die Rolle von Rezeptortyrosinkinasen-Effektoren | 76 |
| 4.4.4. Der Einfluss von PI3K-Effektoren..... | 78 |
| 4.4.4.1. GSK3-beta..... | 78 |
| 4.4.4.2. mTOR | 80 |
| 4.5. Kontrollexperimente | 82 |
| 4.5.1. Untersuchung der Mock-Medium Präparation | 82 |
| 4.5.2. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Verzweigung hippocampaler Neurone | 83 |
| 4.6. Analyse organotypischer hippocampaler Kulturen von Plexin-B1 Knockout-Mäusen | 84 |
| 4.7. Struktur des adulten Hippocampus in Plexin-B1 Knockout-Mäusen | 85 |

| | |
|--|------------|
| 4.8. Die Rolle von Plexin-B2 im Hippocampus | 88 |
| 4.8.1. Expressionsanalyse von Plexin-B2 im Hippocampus | 88 |
| 4.8.2. Plexin-B2 und Sema4D-vermittelte Effekte in hippocampalen Neuronen..... | 90 |
| 4.8.3. Untersuchung von Plexin-B2 Knockout Mäusen | 91 |
| 4.9. Weitere Effekte von Sema4D auf die hippocampale Entwicklung..... | 92 |
| 4.9.1. Entwicklung von Filopodien | 92 |
| 4.9.2. Entwicklung von Synapsen | 93 |
| 5. DISKUSSION | 95 |
| 5.1. Sema4D-vermittelte Effekte in hippocampalen Neuronen: der Kollaps axonaler Wachstumskegel und die Entwicklung axonaler und dendritischer Verzweigungen | 95 |
| 5.2. Die diversen Signalwege der B-Plexine und ihre Beeinflussung der Entwicklung hippocampaler Neurone | 96 |
| 5.3. Der Plexin-B-Rezeptorkomplex bei der Sema4D-vermittelten Verzweigung hippocampaler Neurone | 97 |
| 5.4. Die Signaltransduktion des Plexin-B-Rezeptorkomplexes bei den Sema4D-vermittelten Effekten auf hippocampale Neurone | 98 |
| 5.5. Die Rolle von GSK3-beta und mTOR als Effektoren des Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Akt Signalwegs..... | 100 |
| 5.6. Plexin-B2 und mögliche Kompensationsmechanismen bei der Entwicklung..... | 101 |
| 5.7. Weitere Effekte von Sema4D auf hippocampale Neurone..... | 102 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 104 |
| VERÖFFENTLICHUNGEN UND POSTER..... | 117 |
| DANKSAGUNG | 118 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| A | Adenin |
| AEBSF | 4-(2-Aminoethyl)Benzensulfonylfluorid |
| Amp | Ampicillin |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BES | N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| cAMP | zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| CD | “cluster of differentiation” |
| cDNS | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cGMP | zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat |
| CHO | „Chinese Hamster Ovary“ |
| cm | Zentimeter |
| CNP | 2', 3'-zyklisches Nukleotid 3'-Phosphodiesterase |
| COS-7 | Affen-Nierenzelllinie |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| Da, kDa | Dalton, Kilodalton |
| DCC | “deleted in colorectal cancer” |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| Dig | Digoxigenin |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle's medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dn | dominant-negativ |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotid |
| DOC | Deoxycholat |
| DTT | Dithiothreitol |
| E... | embryonaler Tag ... |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| et al. | und andere („et altera“) |
| FBS | fetales Kälberserum (“fetal bovine serum”) |
| g, mg, µg | Gramm, Milligramm, Mikrogramm |
| G | Guanin |
| GDP | Guanosin-5'-diphosphat |
| GFAP | Saures Gliafaserprotein (“glial fibrillary acidic protein”) |
| GFP | grün-fluoreszierendes Protein |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| HEK | humane Nierenzelllinie (“human embryonal kidney”) |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure |
| HRP | Meerrettichperoxidase (“horseradish peroxidase”) |

| | |
|----------------------|---|
| IB | Immunoblot |
| IHC | Immunhistochemie |
| IPTG | Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid |
| ISH | <i>in-situ</i> -Hybridisierung |
| kb | Kilobasen |
| KO | Knockout |
| l, ml, μ l | Liter, Milliliter, Mikroliter |
| LB | Luria Broth |
| M, mM, μ M | Molar, Millimolar, Mikromolar |
| mA | Milliampere |
| MAPK | „mitogen-activated protein kinase“ |
| Min. | Minute(n) |
| mol, mmol, μ mol | Mol, Millimol, Mikromol |
| MOPS | 4-Morpholinpropansulfonsäure |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NBT/BCIP | Nitroblautetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| NGF | Nervenwachstumsfaktor („nerve growth factor“) |
| NGS | Ziegen Serum („normal goat serum“) |
| nm | Nanometer |
| NT-3 | Neurotrophin-3 |
| N-terminal | Amino-terminal |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatpuffer |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Sek. | Sekunden |
| SN | Supernatant, Überstand |
| Std. | Stunden |
| T | Thymin |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TEA | Triethanolamin |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TRITC | Tetramethylrhodaminisothiocyanat |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |
| WT | Wildtyp |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war den Beitrag von Semaphorin 4D und Plexinen der Gruppe B bei der Entwicklung der Zytoarchitektur von hippocampalen Neuronen näher zu untersuchen. Bisher wird der Sema4D-Plexin-B1 Wechselwirkung im zentralen Nervensystem eine klassische Rolle bei den Semaphorinwirkungen zugeordnet: der Kollaps von axonalen Wachstumskegeln. Dieses Phänomen ist bei hippocampalen und retinalen Neuronen während einer frühen Phase der Neuritenentwicklung aufgezeigt worden. Über die funktionelle Bedeutung der Sema4D-Plexin-B Wechselwirkung bei den nachfolgenden Entwicklungsphasen von Neuriten, der Differenzierung und Reifung, existieren zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Untersuchungen. Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich mit dieser Fragestellung zum einen durch Video-Mikroskopiebeobachtungen und Untersuchungen zur Morphologie hippocampaler Neuronen und zum anderen durch die Analyse hippocampaler Pyramidalneuronen von Plexin-B1 und Plexin-B2 Knockout-Mäusen. Die Behandlung embryonaler hippocampaler Neurone mit Sema4D führte innerhalb von 4 Stunden zu einem Anstieg der dendritischen Verzweigungen und der neuronalen Komplexität. Ferner konnte anhand von Inhibitorexperimenten nachgewiesen werden, dass die Effekte auf die Dendriten über die Rezeptortyrosinkinase Met, PI3K und mTOR vermittelt wurden. Die axonale Verzweigung hing hingegen von der koordinierten Aktivierung der GTPase RhoA und den beiden Rezeptortyrosinkinasen Met und ErbB-2 ab. Über Experimente mit hippocampalen Neuronen aus Plexin-B1 Knockout Mäusen und der Überexpression von dominant-negativem Plexin-B2 konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Plexin-B1, als auch Plexin-B2 an der Signaltransduktion beteiligt waren. Überraschenderweise zeigten sowohl adulte Plexin-B1 Knockout-Mäuse, als auch am postnatalen Tag 5 geborene Plexin-B1 und Plexin-B2 Knockout-Mäuse keine signifikanten Unterschiede in ihrer hippocampalen Schichtung und der Verzweigung hippocampaler Pyramidalneurone. Dies verdeutlicht, dass bei der Morphogenese, als ein essentieller Schritt der Entwicklung von Neuronen, das Wegfallen der Plexine durch weitere Faktoren kompensiert werden konnte oder die Expression der Plexin generell für die Verzweigung von Pyramidalneuronen der CA1-Region keine Bedeutung hatte. Neben den Effekten auf die Verzweigung von Axonen und Dendriten führte die Applikation von Sema4D auch zu einem Anstieg der Anzahl an Filopodien. Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Studie, die eine koordinierte Aktivierung von B-Plexinen mit mTor und einem Anstieg der Verzweigung von Neuriten in direkte Verbindung stellt.

Summary

The aim of this study was to assess the contribution of Semaphorin 4D and Plexin-B proteins in shaping the cytoarchitecture of the hippocampus and of developing hippocampal neurons. Until now, Sema4D-Plexin-B interactions in the central nervous system has been assigned a classical role of semaphorin actions: the collapse of axonal growth cones. This has been demonstrated in hippocampal and retinal neurons over early stages of neurite outgrowth. However the functional role of Sema4D-Plexin-B interactions over subsequent stages of neurite development, differentiation and maturation has not been characterised. In the current dissertation project, this question was addressed using morphogenetic assays and time-lapse imaging on developing hippocampal neurons a model system as well via the analysis of knockout mice lacking the Plexin-B1 or Plexin-B2 proteins.

Treatment of developing hippocampal neurons with Sema4D resulted in a promotion of dendritic branching and neuronal complexity within 4 hours. Furthermore, using specific inhibitors of Plexin coreceptors and downstream targets, we observed that an activation of the receptor tyrosine kinase Met, PI3K and mTOR was crucial for Sema4D-mediated effects on dendritic development, whereas the coordinated activation of the GTPase RhoA, and the two receptor tyrosin kinases Met and ErbB-2 was mandatory for Sema4D mediated axonal branching. Experiments using Plexin-B1 knockout mice and overexpression of a dominant-negative Plexin-B2 construct revealed that both, Plexin-B1 and Plexin-B2 are required for Sema4D-mediated effects on hippocampal neurons. Surprisingly, analysis of adult Plexin-B1 knockout mice and of postnatal day 5 Plexin-B1 and Plexin-B2 knockout mice showed no significant differences in the development of hippocampal layering and branching of hippocampal pyramidal neurons, respectively. This could result from a redundant expression of Plexin-B1 and Plexin-B2 in developing pyramidal neurons or from a compensation by additional factors. Besides its effect on axonal and dendritic branching Sema4D was observed to increase the number of filopodia in hippocampal neurons.

This is the first study that links activation of B-Plexins to mTor and to an functional increase in dendritic and axonal branching of hippocampal neurons.

1. Einleitung

1.1. Semaphorine

Semaphorine bilden die bisher größte identifizierte Familie von Zielführungsproteinen. Sie sind benannt nach den Semaphoren, einem Signalsystem basierend auf Flaggenzeichen, das bei der Navigation von Schiffen und Zügen eingesetzt wird. Seinen Ursprung findet die Familie in der Entdeckung, dass Membranpräparationen von Hühnergehirnen zu einem Kollaps von axonalen Wachstumskegeln führen. Auf diese Weise ist Semaphorin 3A (Sema3A, ursprünglicher Name Collapsin) als erstes molekulares Chemorepellent charakterisiert worden (1-3). Es folgt die Entdeckung von weiteren Semaphorinen, die zu der Entstehung einer Proteinfamilie, deren Mitglieder alle eine konservierte Domäne, die Sema-Domäne, von ca. 500 AS an ihrem N-Terminus teilen, führt (4-6). Bisher sind mehr als 20 Semaphorine identifiziert, die in 8 Klassen, entsprechend der Sequenz-Homologität der Sema-Domänen und ihrer spezifischen weiteren Domänen, eingeteilt werden (7, 8, Abbildung 1). Abgesehen von einigen viralen Semaphorinen enthalten Semaphorine neben der Sema-Domäne eine kurze Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI)- Domäne (1). Semaphorine der Klassen 2, 3, 4 und 7 tragen darüber hinaus eine Immunglobulin (IG)-ähnliche Domäne, in der Klasse 5 befinden sich zusätzlich sieben Thrombospondin-Domänen, die sich ebenfalls bei extrazellulären Matrixproteinen wiederfinden (10).

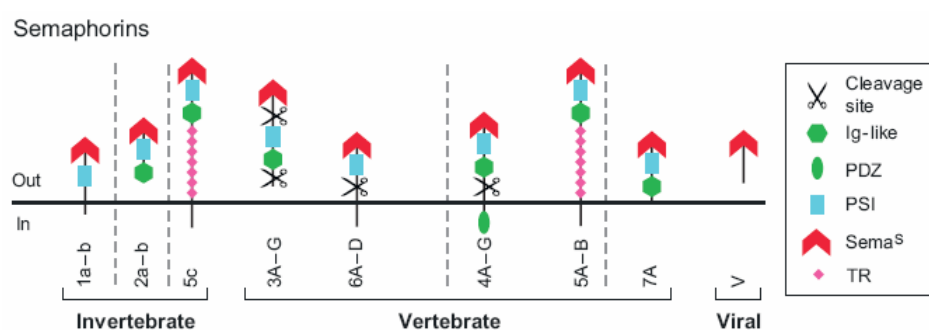


Abbildung 1: Die 8 Klassen der Semaphorine (2, modifiziert). Zu den Semaphorinen zählen transmembranäre, sezernierte und glycosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundene Proteine. Die Klassen 1, 2 und 5c zählen zu den Semaphorinen der Invertebraten, die Klassen 3, 4, 5A, 5B und 7 zu den der Vertebraten und Klasse V zu den viralen Semaphorinen. Neben dem gemeinsamen Merkmal der Sema-Domäne tragen die Klassen 2, 3, 4 und 7 zusätzlich eine Immunglobulin (Ig)-Domäne, die Klasse 5 verfügt über sieben Thrombospondin-Domänen und die Klasse 4 besitzt eine intrazelluläre PDZ (Postsynaptic density 95/ Discs. large/ Zonula occludens1)-Domäne.

Die bei der Klasse 4 vorzufindende C-terminale PDZ-Domäne vermittelt eine Oligomerisierung dieser Semaphorine (3) und ist für die synaptische Lokalisation von Bedeutung (4, 5). Semaphorine der Klassen 1, 2 und 5C werden ausschließlich von Invertebraten, die Klassen 3, 4, 5A-B und 7 von Vertebraten und Klasse V von Viren exprimiert. Zu den sezernierten Semaphorinen zählen die Klassen 2, 3 und V. Die Klassen 1, 4, 5 und 6 sind über eine transmembranäre (TM)-Domäne und Klasse 7 über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden. Außerdem können Semaphorine der Klassen 4, 6 und möglicherweise auch der Klasse 7 durch proteolytische Spaltung in eine sezernierte, lösliche Form überführt werden (15-19). Die Vielfältigkeit der Proteinstruktur von Semaphorinen ermöglicht ihnen sowohl membrangebunden über kurze Distanz, als auch sezerniert über große Entfernungen zu fungieren (6). Des Weiteren können Semaphorine mit einzelnen Rezeptoren oder Rezeptorkomplexen interagieren oder selbst als Rezeptor in Erscheinung treten. Seit der Entdeckung der Semaphorine und ihrer repulsiven Wirkung auf axonale Wachstumskegel ist ein breites Spektrum an Semaphorinwirkungen beschrieben worden, auf das unter Kapitel 1.3 genauer eingegangen wird. Es scheint jedoch, dass für die Semaphorin-vermittelten Wirkungen, zumindest bei einigen Semaphorinen, eine Dimerisierung über die jeweilige Sema-Domäne notwendig ist (1). Bisher können Dimerisierungen bei Sema3A (21, 22), Sema4D (7, 8) und Sema5A (24, 25) nachgewiesen werden.

1.2. Semaphorinrezeptoren

1.2.1. Neuropiline

Bei der Expressionsanalyse mit einer Sema3A-Sonde ist erstmals Neuropilin-1(Nrp-1) als ein essentieller Bestandteil des Sema3A-Rezeptors beschrieben (9). Ursprünglich ist Nrp-1 als Antigen identifiziert worden, das spezifisch im „Optic Tectum“, dem Gewebe im Bereich der Kreuzung der Sehnerven, von *Xenopus tadpoles* exprimiert wird (10). Wie sich herausgestellt hat, binden Nrp-1 und Nrp-2, ein Neuropilin aus der gleichen Proteinfamilie, sämtliche Semaphorine der Klasse 3, jedoch mit unterschiedlicher Affinität (11, 12). Sema3A bindet bevorzugt an Nrp-1, Sema3F an Nrp-2 und Sema3C an ein Heterodimer aus Nrp-1 und Nrp-2 (30, 31). Die verschiedenartigen Wirkungen der Klasse 3 Semaphorine liegen in den Unterschieden der Aktivierung von Neuropilin-enthaltenden Rezeptoren. So ist beispielsweise gezeigt worden, dass Sema3B und Sema3C agonistisch an Nrp-2 Rezeptorkomplexen wirken, an Nrp-1 Rezeptorkomplexen jedoch eine kompetitiv antagonistische Wirkung im Bezug auf

Sema3A entfalten (13). Neuropiline werden nur in Vertebraten, Semaphorine aber in Vertebraten und Invertebraten exprimiert. Außerdem bilden Neuropiline allein keine vollständigen Semaphorinrezeptoren, ihre intrazellulären Domänen sind für eine Semaphorin-abhängige Signaltransduktion nicht relevant (14). Auf der Suche nach Korezeptoren sind Plexin-C1 als Rezeptor für virales Semaphorin A39R (Sema Va) und Drosophila Plexin-A für Drosophila Sema-1a entdeckt worden (15, 16). Plexine stellen mittlerweile die Hauptgruppe der Semaphorinrezeptoren dar. Einzig Klasse 3 Semaphorine benötigen neben den Plexinen Neuropiline als Korezeptoren (36). Ihre Aufgabe besteht in der Bindung von Liganden über ihre extrazelluläre Domäne und in der Stabilisierung des Rezeptorkomplexes mittels ihrer kurzen intrazellulären Domäne (17).

Neuropiline treten nicht ausschließlich mit Plexinen in Erscheinung. Der Rezeptorkomplex für Sema3A enthält neben A-Plexinen und Nrp-1 auch das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1 CAM, das für eine repulsive Wirkung auf kortikale Neurone von entscheidender Bedeutung ist (18, 19). Neben Plexinen bilden Neuropiline auch Rezeptorkomplexe mit dem „vascular endothelial growth factor“ (VEGF)- Rezeptor (40).

1.2.2. Plexine

Plexine gehören zu den bekanntesten und am breitesten exprimierten Semaphorinrezeptoren. Es handelt sich um große hochkonservierte transmembranäre Proteine, die sowohl in Vertebraten, als auch in Invertebraten Semaphorine binden und entsprechende Signale transduzieren (20, 21). In *C.elegans* und *Drosophila* sind bisher zwei Plexine (Plexin-A und – B) beschrieben, in Vertebraten sind derzeit neun Plexine, die in 4 Gruppen (Plexin A-D) eingeteilt werden, identifiziert (35, 43, Abbildung 2). Alle Plexine enthalten extrazellulär eine Sema-Domäne und bilden zusammen mit den Semaphorinen und den Rezeptor-Tyrosinkinasen Met, Ron und Sea die Protein-Superfamilie der Sema-Domänen enthaltenden Proteine (22-24).

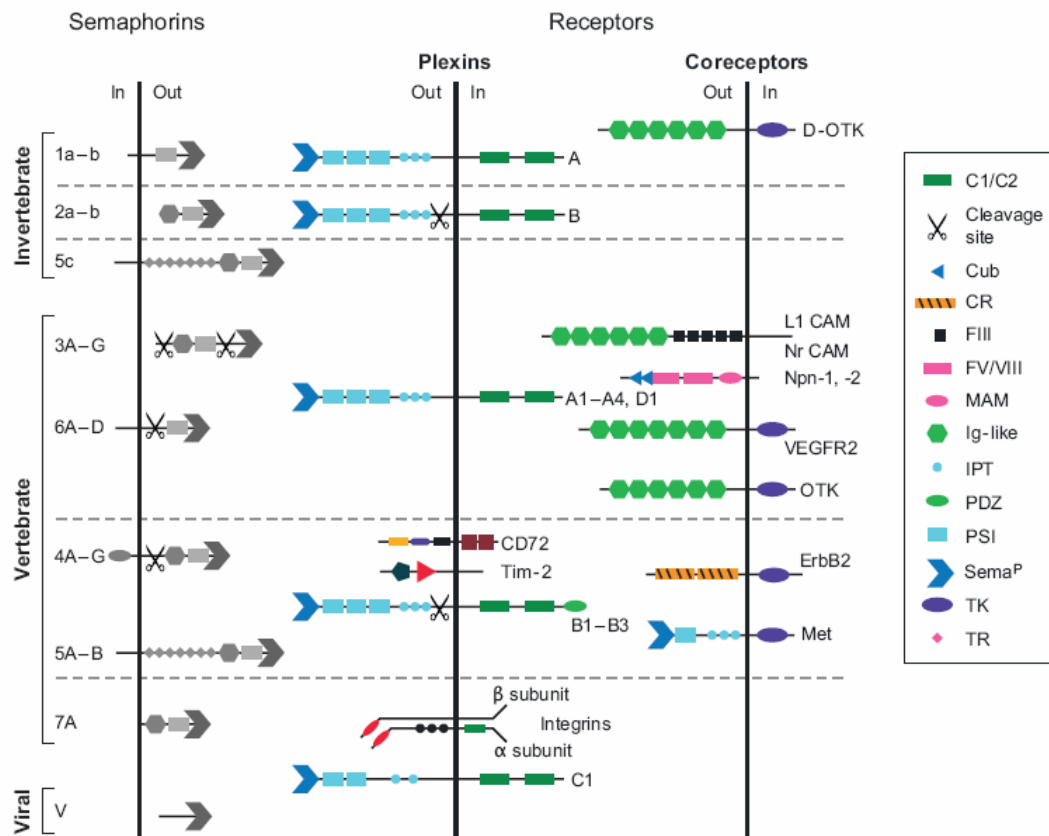


Abbildung 2: Semaphorinrezeptoren (2, modifiziert). Plexine sind transmembranäre Proteine, die extrazellulär eine Sema-Domäne und drei, im Falle von Plexin-C1 zwei PSI-Domänen gemein haben. Intrazellulär zeichnet Plexine eine SP-Domäne, bestehend aus einer C1 und C2 Domäne aus. Plexin-A und Plexin-B werden von Invertebraten exprimiert, Plexin-A tritt im Rezeptorkomplex mit D-OTK auf. Zu den Plexinen der Vertebraten zählen Plexin-A1- A4, Plexin-D1, Plexin-B1-B3 und Plexin-C1. Plexine der Gruppe A gehen mit Neuropilinen (Npn), dem „L1 cell adhesion molecule“ (L1 CAM), dem „vascular endothelial growth factor receptor 2“ (VEGFR2) und „Offtrack“ (OTK) Rezeptorkomplexe ein. Plexine der Gruppe B treten mit ErbB-2 und Met in Rezeptorkomplexen in Erscheinung. Neben den Plexinen sind CD72, Tim-2 und Integrine ebenfalls Semaphorinrezeptoren. Domänen: Cub, „complement binding“; FIII, „fibronectin type III“; FV/VIII, „coagulation factor“, Ig-like, „immunoglobulin-like“; IPT, „Ig-like, plexins, transcription factor domains“; MAM, „Meprin, A5, Mu“; PDZ, „PDZ binding site“; PSI, „plexin-semaphorin-integrin domain“, SemaP, „sema domain of plexins“; TR, „thrombospondin“; TK, „tyrosine kinase“.

1.2.3. Weitere Semaphorinrezeptoren

Neben Plexinen, Neuropilinen und ihren Rezeptorkomplexen mit VEGF und L1 CAM können Semaphorine auch direkt an Integrine binden. Semaphorin 7A vermittelte Effekte auf axonales Wachstum werden Plexin-unabhängig über $\beta 1$ -Integrine transduziert (25). Für Semaphorine der Klasse 4 ist gezeigt worden, dass diese ohne eine Beteiligung von Plexinen regulatorisch auf das Immunsystem wirken. Sema4D bindet spezifisch CD72, ein Protein der

C-Typ Lectin Familie, auf B-Zellen (26) und Sema4A bindet spezifisch Tim 2, ein Protein, das ausschließlich von T-Zellen exprimiert wird (27).

1.3. Semaphorin/ Plexin Funktionen

Sezernierte und membrangebundene Semaphorine sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören unter anderem die Entwicklung und Regeneration des zentralen und peripheren Nervensystems, die kardiovaskuläre Entwicklung, ein regulatorischer Einfluss auf das Immunsystem und die Beteiligung an malignen Prozessen.

1.3.1. Entwicklung des Nervensystems

Die Etablierung eines Systems von neuronalen Verbindungen bei der Entwicklung des Nervensystems hängt von einer Vielzahl attrahierender oder repulsiver Substanzen, „guidance cues“, ab. Diese „guidance cues“ haben zur Aufgabe die Richtungen und Verzweigungen axonalen und dendritischen Wachstums zu bestimmen. Sie spielen außerdem eine für die neuronale Migration entscheidende Rolle, bei der Neurone auf Ihre entsprechenden Positionen geleitet werden. Die Wahrnehmung dieser Signale erfolgt über den Wachstumskegel, eine hochdynamische Struktur an der Spitze von Neuriten. Während der Migration zu ihrem Zielgebiet empfangen und interpretieren neuronale Wachstumskegel eine Vielzahl von attrahierenden und repulsiven Signalen. Die Verarbeitung der Informationen hängt in einem hohen Maße von einem komplexen Netzwerk intrazellulärer Signalwege ab. Ihre koordinierte Aktivierung wird von dem räumlichen und zeitlichen Auftreten der jeweiligen „guidance cues“ und ihrer Rezeptoren bestimmt (2, 28-30).

Semaphorine sind mit Sema3A als axonal repulsiv wirkende Proteinfamilie in Erscheinung getreten (31, 32). Mittlerweile sind eine Vielzahl von Semaphorinen identifiziert, die repulsiv (33-40), attrahierend (36, 40, 41) oder bifunktional wirken (41-43). Im Falle von Sema3A ist gezeigt worden, dass die Bifunktionalität entscheidend von der Konzentration an intrazellulären cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) abhängt. Eine Erhöhung des cGMP Spiegels konvertiert die repulsive Wirkung in eine attrahierende, ein Absenken des cGMP Spiegels erhöht die repulsive Wirkung von Sema3A (43).

Semaphorine spielen neben der Navigation von Neuriten eine Rolle bei der Migration von Neuronen. Sema3A inhibiert die Migration von Neuronen der Neuralleiste (44, 45). Sema3A und Sema3F wirken repulsiv auf kortikale Interneurone und verhindern deren Migration in

das Striatum (46). Erst kürzlich ist gezeigt worden, dass *Sema3A* auch bei der radialen Migration von kortikalen Neuronen eine wichtige Rolle spielt. *Sema3A* wird in einem absteigenden Gradienten über die verschiedenen Kortexschichten exprimiert, während der *Sema3A*-Rezeptor, *Neuropilin-1*, in hohem Maße von migrierenden Neuronen exprimiert wird. *Sema3A* wirkt in diesem Falle chemoattrahierend auf migrierende Neurone (47). Neben *Sema3A* ist auch für *Sema6A* eine Wirkung auf die axonale Navigation und neuronale Migration nachgewiesen worden. Zum einen hat *Sema6A* einen repulsiven Effekt auf sympathische und sensorische Axone (48), zum anderen kontrolliert *Sema6A* die Migration von Körnerzellen des Cerebellums (49).

1.3.2. Regeneration des Nervensystems

Nach der Verletzung von Nervenfasern im ZNS tritt eine verstärkte Expression von wachstumshemmenden Molekülen auf, die für die fehlende Regeneration von zentralen Neuronen verantwortlich gemacht werden. Bei *Sema3A* handelt es sich um solch eine wachstumshemmende Substanz. Es verhindert nach Verletzung der thorakalen Rückenmarkshinterstränge der Ratte eine Regeneration der aufsteigenden Nervenbahnen (50). Es ist nachgewiesen worden, dass die aufsteigenden Nervenfasern die *Sema3A* Rezeptoren *Plexin-A1* und *Neuropilin-1* exprimieren und dass *Sema3A* verstärkt von Fibroblasten entlang der Läsion exprimiert wird. Die repulsive Wirkung von *Sema3A* verhindert ein Einwachsen der Nervenfasern in die Läsion und inhibiert auf diese Weise die Regeneration (51).

Im Falle von *Sema4D* ist gezeigt worden, dass es auf Oligodendrozyten im postnatalen ZNS der Maus exprimiert wird und es nach einer Verletzung im Bereich des Rückenmarks die Expression lokal erhöht wird. *Sema4D* wirkt inhibitorisch auf postnatale sensorische Axone und bewirkt damit ebenfalls eine Inhibition der Regeneration (52).

1.3.3. Entwicklung des kardiovaskulären Systems

Sezernierte Klasse 3 Semaphorine spielen eine Rolle bei der Endothelzellenadhäsion, bei ihrer Motilität und bei der Entwicklung des vaskulären Systems. *Sema3A* inhibiert die Endothelzellenmigration und die *in vitro* Angiogenese (53). Zudem inhibieren Endothelzellen während der vaskulären Entwicklung und bei der *in vitro* Angiogenese über autokrin sezernierte Semaphorine der Klasse 3 Integrine. Durch die verminderte Integrinaktivität

erlangt das vaskuläre System die zur Entwicklung oder Umorganisation benötigte Plastizität (54).

Sema3A Knockout-Mäuse zeigen eine Hypertrophie des rechten Ventrikels und eine Dilatation des rechten Vorhofs des Herzens (55). Sema3C Knockout-Mäuse sterben pränatal aufgrund von kardiovaskulären Defekten (56). Für Sema3E ist auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Gefäßsystems gezeigt worden (57-59). Sema3E wirkt repulsiv auf die Plexin-D1 exprimierenden Endothelzellen der intersomitischen Gefäße. Sowohl in Sema3E, als auch in Plexin-D1 Knockout-Mäusen ist der Aufbau des Gefäßsystems gestört.

Für Sema4D, ein Semaphorin der Klasse 4, kann ebenfalls ein proangiogener Effekt nachgewiesen werden. Dieser Effekt beruht auf einer Wechselwirkung mit Plexin-B1 und einer Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase Met (60).

1.3.4. Regulation des Immunsystems

Semaphorine der Klassen 3, 4 und 7 sind an der Regulation der Immunantwort beteiligt (61). Sema3A hat einen inhibitorischen Effekt auf die Migration von Monozyten (62) und CRMP2, ein Sema3A Effektor, ist an der Migration von aktivierten T-Lymphozyten beteiligt (63). Sema3A spielt daher möglicherweise bei der Regulation von der Besiedlung lymphatischer Organe mit haematopoetischen Vorläuferzellen oder an der Migration von Lymphozyten aus dem Blutfluss zu einem Entzündungsherd eine Rolle.

Sema4D ist das erste Semaphorin, das mit Aufgaben im Immunsystem in einen Zusammenhang gebracht worden ist (64). Hierbei spielt Sema4D eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen. In der Maus erhöht Sema4D eine CD40- oder Lipopolysaccharid (LPS)-bedingte Aktivierung von B-Zellen (65). Außerdem werden die Aggregation und die Differenzierung von B-Zellen gefördert (64). Der Rezeptor für Sema4D im Immunsystem ist CD72 (26). Sema4D aktiviert B-Zellen, indem es die inhibitorische Wirkung von CD72 aufhebt (26). Sema4D scheint auch an verschiedenen neuroinflammatorischen Erkrankungen beteiligt zu sein. So ist bei Multipler Sklerose oder T-lymphotropischer Virus assoziierter Myelopathie ein erhöhter Sema4D-Spiegel in cerebrospinalen Flüssigkeit festgestellt worden (66), während Sema4D Knockout-Mäuse gegen eine experimentell ausgelöste Autoimmun-Encephalomyelitis resistent erscheinen (67). Sema4A wirkt im Immunsystem über seinen Rezeptor Tim-2 und ist für die Generierung von Antigen-spezifischen T-Zellen von Bedeutung (27). Sema7A wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und stimuliert die

Zytokinproduktion in Monozyten und Makrophagen über alpha1/beta1 Integrin. Dies spielt eine entscheidende Rolle bei T-Zellen-vermittelten entzündlichen Reaktionen (68).

1.3.5. Assoziierte Krankheiten

Neben ihrer in Kapitel 1.2.4. erwähnten Beteiligung an Autoimmunerkrankungen spielen Semaphorine und Plexine eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren.

Semaphorine der Klasse 3 werden mit einer Funktion als Tumorsuppressorgene in Verbindung gebracht. Sema3B und Sema3F sind bei der Untersuchung einer speziellen homozygoten Deletionsregion des Menschen entdeckt worden, die beim kleinzelligen Bronchialkarzinom und anderen Krebsarten von Bedeutung ist (69-72). Die Reexpression von Sema3B erhöht die Apoptose in Bronchial- und Mammakarzinomen (73, 74). Für Sema3F kann gezeigt werden, dass es die Tumorgenese (72) und Bildung von Melanommetastasen (75) unterdrückt. Außerdem vermindert Sema3F die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit von Melanomzellen (75). Die Verminderte Motilität steht möglicherweise mit einer Abnahme der β 1-Integrin-vermittelten Adhäsion im Zusammenhang. Bei der Angiogenese ist bereits für Sema3A eine Hemmung der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit durch Hemmung der Integrin-Aktivierung beschrieben (54).

Semaphorine aus der Klasse 4 fördern im Gegensatz zu den Semaphorinen der Klasse 3 das Wachstum von Tumoren. Sema4D wird in hohem Maße von Endothelzellen exprimiert und steigert die Endothelzellenmigration und Tubulogenese (76). Eine Funktion bei der tumorinduzierten Angiogenese ist ebenfalls beschrieben worden. So ist bei einer Genanalyse von Zelllinien aus primären und metastasierten squamösen Karzinomen des Kopf- und Nackenbereichs eine erhöhte Expression von Sema4D festgestellt worden. Ein „Knockdown“ von Sema4D in diesen Zelllinien mit nachfolgender Transplantation in Mäuse resultiert in einer erheblichen Reduzierung der Tumolvaskularität und einem verminderten Tumorstadium (77). Die Aktivierung von Plexinen führt zu einer Vielzahl von Effekten, die dem Phänotypen eines invasiven Karzinoms entsprechen (78, 79). Für die Sema4D-vermittelte Aktivierung von Plexin-B1 ist gezeigt worden, dass hierdurch auch der Hepatozyten Wachstumsfaktor c-Met gebunden und aktiviert wird (80). Die Aktivierung führt zum invasiven Wachstum, einem komplexen biologischen Programm, wodurch Zellen dissoziieren, durch die extrazelluläre Matrix migrieren und an neuer Stelle kolonisieren, proliferieren und differenzieren (21, 79). Erst kürzlich ist herausgefunden worden, dass beim

primären und sekundären Protatakarzinom, Knochen- und Lymphknotenmetastasen Mutationen am PlexinB1 Gen vorliegen (81).

1.4. Semaphorin 4D

Bei Sema4D, auch unter dem Namen CD100 bekannt, handelt es sich um ein 150 kDa großes transmembranäres Glykoprotein. An seinem N-Terminus befindet sich eine aminoterminal Sequenz, gefolgt von einer Sema-Domäne, einer Immunglobulin-ähnlichen (Ig-like) Domäne, einem lysinreichen Bereich, einer hydrophoben transmembranären Region und einem zytoplasmatischen Ende (82, 83). Die extrazelluläre Domäne enthält außerdem mögliche N-gebundene Glykosylierungsstellen (64, 84). Die Sema-Domäne ist eine konservierte Sequenz von ca. 500 Aminosäuren, die bei Semaphorinen, Plexinen und dem „Scatter-Factor“-Rezeptor zu finden ist. Sie wird von einer kurzen, konservierten cysteinreichen Sequenz (MRS, Met-related sequence, oder auch als PSI-Domäne, Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne, bezeichnet) flankiert (1, 6, 85). Die Sema-Domäne bildet einen siebenfachen β -Propeller, bei dem es sich um ein Homo- bzw. Heterodimerisierungsmotif handelt (8). Tatsächlich wird Sema4D auf der Zelloberfläche als Homodimer exprimiert. Eine Mutationsanalyse von humanem Sema4D offenbart, dass Cystein⁶⁷⁹ für die Homodimerisierung notwendig ist (62), die wiederum für die biologische Wirkung von Sema4D benötigt wird (7). Innerhalb der zytoplasmatischen Region sind keine katalytischen Domänen enthalten, jedoch finden sich hier Konsensusstellen für die Tyrosin- und Serinphosphorylierung (64, 84). Es ist nachgewiesen worden, dass nach zellulärer Aktivierung die Expression von Sema4D auf der Zelloberfläche hochreguliert wird (26, 67, 86). Das transmembranäre Sema4D kann dann proteolytisch in eine 120 kDa große lösliche Form abgespalten werden (62, 87-91). Die Bildung von löslichem Sema4D ist von einer proteolytischen Kaskade abhängig, die nach zellulärer Aktivierung in Gang gesetzt wird (87). Die Frage nach Unterschieden in der biologischen Aktivität der gespaltenen und transmembranären Form von Sema4D ist noch nicht abschließend geklärt. Der Großteil der Sema4D vermittelten biologischen Effekte ist durch rekombinantes oder natürlich gespaltenes lösliches Sema4D aufgeklärt. Für gebundenes transmembranäres Sema4D kann gezeigt werden, dass es mit CD45 einen Komplex eingeht und eine Rolle bei der Aktivierung von B- und T- Lymphozyten spielt (90, 92). Ein weiterer Hinweis für eine Rolle als Rezeptor ist die Tatsache, dass Sema4D an seinem zytoplasmatischen Ende eine Serinkinase binden kann (89, 93).

Beim Menschen ist Sema4D mRNA in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen worden, unter anderem im embryonalen und erwachsenen Gehirn, in der Niere und im Herzen (64). In Mäusen ist ebenfalls eine starke Expression im embryonalen, neuronalen Gewebe festgestellt worden, weiterhin im Thymus, Lunge und Niere (84, 94). Sema4D wird außerdem von der Großzahl der haematopoetischen Zellen exprimiert, mit Ausnahme der sich entwickelnden Knochenmarkszellen, der roten Blutkörperchen und der Thrombozyten (83).

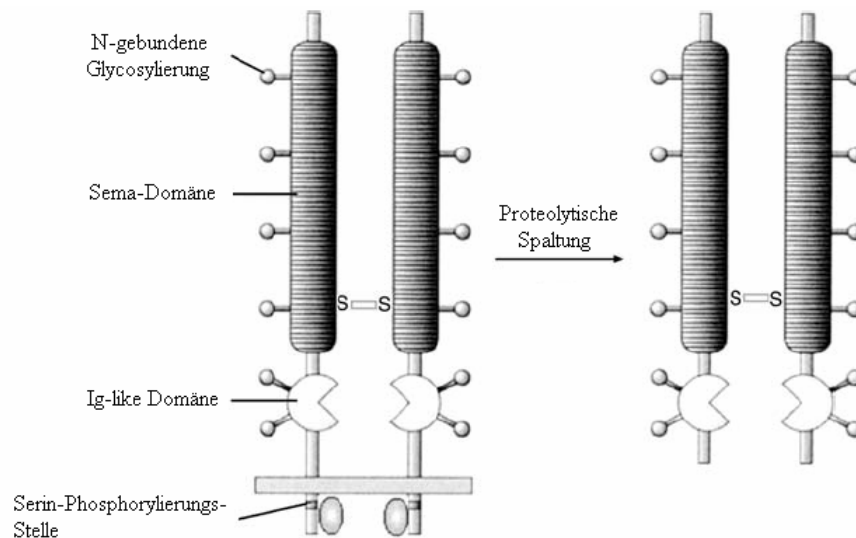


Abbildung 3: Semaphorin 4D (85, modifiziert) Sema4D enthält eine aminoterminal Signalsequenz, eine Sema-Domäne, eine Ig-ähnliche Domäne, eine Lysin-reiche Region, eine transmembranäre Region und ein zytoplasmatisches Ende. Zudem enthält Sema4D mehrere N-gebundene Glykosylierungsstellen. Innerhalb der zytoplasmatischen Region befinden sich Konsensusstellen für eine Serinphosphorylierung. Sema4D kann proteolytisch von der Zellmembran abgespalten und in eine lösliche Form überführt werden.

1.5. B-Plexine

Zu den B-Plexinen zählen Plexin-B1, Plexin-B2, und Plexin-B3. Es handelt sich um große transmembranäre Proteine. N-terminal befindet sich eine Sema-Domäne, drei Cystein-reiche Motife (MRS-, bzw. PSI- Domänen), eine potentielle Spaltstelle für Furin-ähnliche Proteasen, eine transmembranäre Domäne und eine ca. 600 AS große zytoplasmatische „Sex and Plexins“ (SP) Domäne, welche wiederum in eine C1- und C2-Domäne aufgeteilt wird (22, 23).

1.5.1. Korezeptoren

B-Plexine können wie A-Plexine (vgl. Kapitel 1.2.1) mit anderen Rezeptoren wechselwirken. So interagieren sämtliche B-Plexine ligandenunabhängig mit den Rezeptortyrosinkinasen Met (80, 95) und ErbB-2 (96). In diversen Zelllinien kann nachgewiesen werden, dass die Bindung von Sema4D an Plexin-B1 die Tyrosinkinaseaktivität von Met stimuliert (80). Dies führt zu einer Tyrosinphosphorylierung beider Rezeptoren. Met kann somit entweder direkt über die Bindung seines Liganden SF-1 („Scatter-factor 1“, auch „Hepatocyte-growth-factor“) oder indirekt über die Bindung von Sema4D an Plexin-B1 aktiviert werden. Die Bindung von Sema4D an Plexin-B1 stimuliert auch die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität von ErbB-2 (96). Dies führt wie bei Met zur Phosphorylierung beider Rezeptoren. Der Unterschied der Rezeptorinteraktionen zwischen Plexin-B1 und Met, bzw. ErbB-2 zeigt sich bei der Bindung von Liganden an die jeweilige Rezeptortyrosinkinase. Die Bindung von SF-1 an Met führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von Plexin-B1, wohingegen eine Bindung von EGF an ErbB-2 in einer verminderten Phosphorylierung von Plexin-B1 resultiert. Die Aktivierung von Met führt zu einer erhöhten Zellmigration und zu invasivem Wachstum (80). ErbB-2 wird hingegen bei der Plexin-B1-vermittelten Aktivierung von RhoA und bei dem Sema4D-induzierten Kollaps von Wachstumskegeln bei hippocampalen Neuronen benötigt (96). Erst kürzlich ist gezeigt worden, dass Sema4D in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Plexin-B1-Rezeptorkomplexe gegensätzliche Effekte ausüben kann. So wird in Gegenwart von ErbB-2 RhoA aktiviert, in Gegenwart von Met hingegen inaktiviert. Im Falle einer Mammakarzinom-Zelllinie äußert sich das in einem pro-, bzw. antimigratorischen Verhalten der Zellen (97).

Plexin-B1 kann außerdem mit Plexin-A1 über die zytoplasmatische Domäne interagieren (98). Eine funktionelle Bedeutung ist jedoch noch nicht entdeckt.

1.5.2. Signaltransduktion

Die extrazelluläre Domäne von Sema4D bindet an seinen Rezeptor Plexin-B1. Als Folge kommt es zu einem Kollaps von axonalen Wachstumskegeln hippocampaler Neurone und zur Kontraktion von COS-7 Zellen, welche Plexin-B1 und Rnd1 koexprimieren (99, 100). Sema4D kann über die Aktivierung von Plexin-B1 die Funktionalität von 4 GTPasen beeinflussen. So interagiert Plexin-B1 direkt mit den GTPasen R-Ras, Rac1 und Rnd1.

Zusätzlich wird die Aktivität von RhoA über PDZ-RhoGEF/ LARG (100-103) und p190RhoGAP (104) reguliert.

Bei Plexin-B1 handelt es sich um das erste Plexin, dem eine GAP-Aktivität nachgewiesen worden ist (105, 106). Rnd1 und Plexin-B1 liegen dauerhaft assoziiert vor (99). Diese Bindung inhibiert die basale GAP-Aktivität von Plexin-B1 (105, 106). Die Bindung zwischen Rnd1 und Plexin-B1 ist unabhängig von Sema4D. Sie ist für eine Plexin-B1 vermittelte Stimulierung der GTPase-Aktivität von R-Ras notwendig, aber nicht ausreichend. Hierfür ist neben der Rnd1 Bindung ein „Clustering“ der Plexin-B1 Rezeptoren notwendig. Eine Bindung von Sema4D an Plexin-B1 führt innerhalb kürzester Zeit zu solch einem „Clustering“ (105, 106). Die Sema4D vermittelte Stimulierung der GAP-Aktivität führt zu einer Abnahme an aktiviertem R-Ras. Aktiviertes, GTP-gebundenes, R-Ras aktiviert Integrine und führt zu einer Integrin-basierten Adhäsion von Zellen (107). Eine Abnahme der Integrinaktivität führt zu der anfangs beschriebenen Kontraktion von Cos-7 Zellen und zu dem Kollaps axonaler Wachstumskegel.

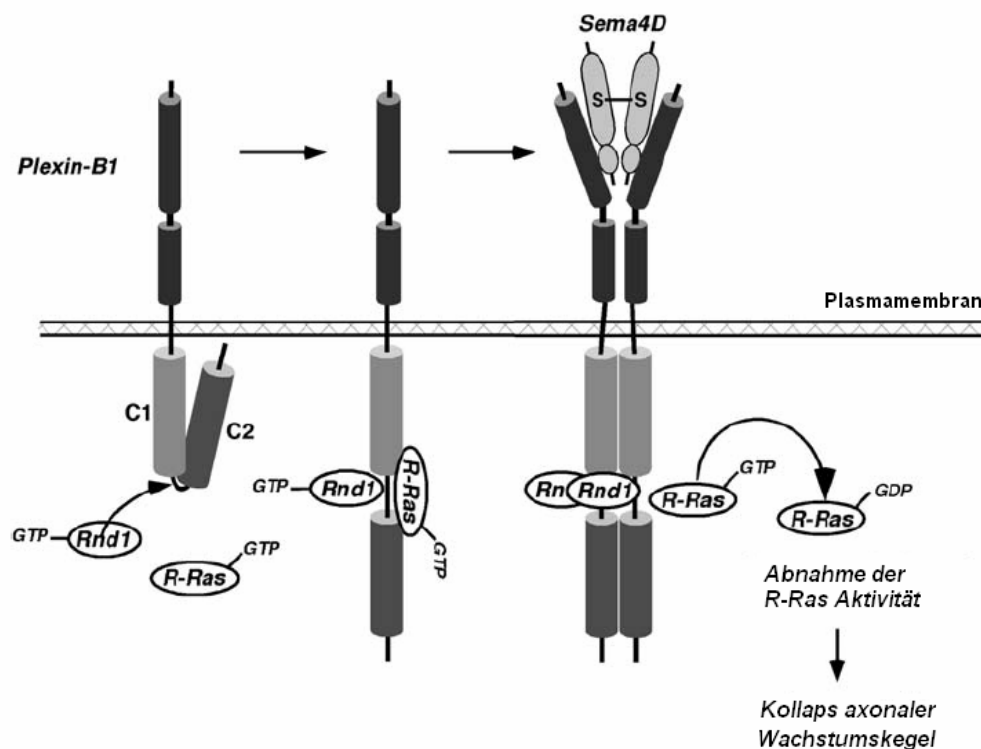


Abbildung 4: B-Plexin-Signaltransduktion I (108, modifiziert) Rnd1-Bindung an den zytoplasmatischen Teil von Plexin-B1 führt zu einer Entfaltung der miteinander interagierenden C1 und C2 Domänen. Es wird dem Rezeptor hierdurch ermöglicht GTP-gebundenes R-Ras anzulagern. Sema4D-vermitteltes „Clustering“ von Plexin-B1 Rezeptoren unterstützt die Hydrolyse von GTP durch R-Ras. Die verminderte R-Ras Aktivität führt zu einer reduzierten Zelladhäsion und dem Kollaps axonaler Wachstumskegel.

Neben Rnd1 geht Plexin-B1 eine Sema4D-vermittelte, starke Bindung mit Rac1 ein (109). Aktives Rac1 führt zu keiner Kontraktion von Plexin-B1 exprimierenden COS-7 Zellen (99). Die Bindung von aktiviertem Rac1 könnte Plexin-B1 mit Pak in einen Zusammenhang bringen. Plexin-B1 und Pak können kompetitiv um die Bindung von aktiviertem Rac1 konkurrieren. Dies hätte eine verminderte Rac-abhängige Aktivierung von PAK zur Folge. Dieses Konkurrenzverhältnis ist bereits in einem heterogenen Zellsystem beschrieben worden, zusammen mit der Tatsache, dass aktiviertes Rac die Anzahl an Plexin-B1 Rezeptoren auf der Zellmembran erhöht und zu einer verbesserten Bindung zwischen Sema4D und Plexin-B1 führt (110).

RhoA ist eine weitere GTPase, die über Sema4D/Plexin-B1 aktiviert wird und die eine wichtige Rolle bei Sema4D vermittelten Effekten spielt. So kann der Kollaps von axonalen Wachstumskegeln hippocampaler Neurone über eine Hemmung von RhoA, durch C3 Exoenzym, oder ROCK, durch Y-27632, inhibiert werden (100). Die Sema4D vermittelte Kontraktion von Plexin-B1- und Rnd1-exprimierenden COS-7 Zellen kann ebenfalls durch ein dominant-negatives RhoA-Konstrukt und Y-27632 blockiert werden (99). Die Bindung von Sema4D an Plexin-B1 führt zu einem Anstieg der RhoA-Aktivität, wenn der Rezeptor mit den RhoGEFs PDZ-RhoGEF oder LARG koexprimiert wird. Plexin-B1 ist konstitutiv mit diesen RhoGEFs über das C-terminale PDZ-Bindungsmotif verbunden. Das PDZ-Bindungsmotif ist allen B-Plexinen gemein (100). Die Interaktion ist unabhängig von Sema4D (101-103) und in Gegenwart von Rnd1 erhöht (99, 100). Es ist auch erwiesen, dass eine erhöhte Expression von Rnd1 zu einer erhöhten Bindung von PDZ-RhoGEF führt, was wiederum in einer erhöhten Sema4D vermittelten Aktivierung von RhoA resultiert. Die Expression von einem dominant-negativen PDZ-RhoGEF Konstrukt hingegen blockiert die Kontraktion von COS-7 Zellen und den Kollaps axonaler Wachstumskegel hippocampaler Neurone.

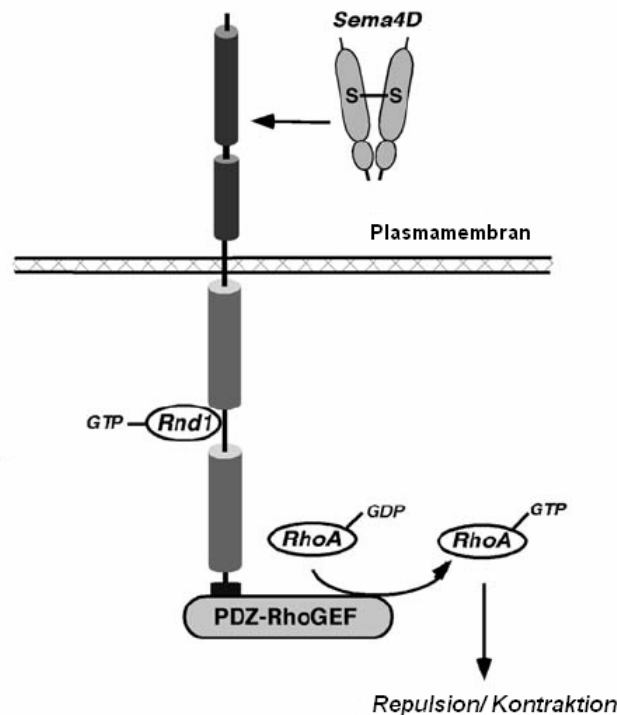


Abbildung 5: B-Plexin-Signaltransduktion II (108, modifiziert) Am C-Terminus von Plexin-B1 befindet sich ein PDZ-Bindungsmotif, das konstitutiv Rho-spezifische GEFs, PDZ-RhoGEF und LARG bindet. Die Bindung von Rnd1 an den zytoplasmatischen Teil führt zu einer verstärkten Bindung von PDZ-RhoGEF. Sema4D aktiviert RhoA über PDZ-RhoGEF und führt zu einer repulsiven Reaktion.

Überraschenderweise bindet Plexin-B1 auch p190 RhoGAP und erhöht damit die GAP-Aktivität (104). Diese Entdeckung steht in einem direkten Widerspruch zu dem Sema4D induzierten Anstieg von aktiviertem RhoA, der im Zusammenhang mit PDZ-RhoGEF und LARG beschrieben worden ist (100). Außerdem ist in einigen Zelllinien nach einer Sema4D vermittelte Aktivierung von Plexin-B1 von einer Verminderung der RhoA-Aktivität berichtet worden (104). P190 RhoGAP ist an den Semaphorin-vermittelten Wirkungen in Epithelzellen, primären Endothelzellen und Neuroblasten beteiligt. Eine mögliche Erklärung dieser gegensätzlichen Wirkungen kann in der Beteiligung von Korezeptoren liegen. Plexin B1 aktiviert nach Sema4D-Bindung, wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben, in Gegenwart von ErbB-2 RhoA, in Gegenwart von Met wird RhoA inhibiert (97).

1.6. Aufbau und Struktur des Hippocampus

In dieser Studie wird der Hippocampus als Modellsystem verwendet, um den Einfluss von Sema4D auf das Wachstum von Neuronen zu untersuchen. Der Hippocampus, Allokortex, eignet sich insbesondere als Modell, da er im Gegensatz zum phylogenetisch jüngeren 6-schichtigen Neokortex eine relativ einfache Struktur aufweist. Der Hippocampus und der Gyrus dentatus bestehen jeweils nur aus einer Schicht Prinzipalneuronen, den Pyramidenzellen und den Körnerzellen. Die Pyramidenzellschicht wird in 4 Hauptabschnitte eingeteilt, dem Subikulum, der CA1-Region, bestehend aus kleinen Pyramidenzellen, der CA2-Region, ein schmales dichtes Band großer Pyramidenzellen und der CA3-Region, einem breiten und lockeren Band großer Pyramidenzellen. Das schmale Band dicht gepackter Körnerzellen des Gyrus dentatus umfasst das auslaufende Band der Pyramidenzellen der CA3-Region. Der Hippocampus gliedert sich in 5 Schichten. Innen, am Ventrikel gelegen, befindet sich der Alveus hippocampi. Hier sammeln sich die afferenten Nervenbahnen, die den Hippocampus verlassen. Es folgt das Stratum oriens, das Korbzellen enthält, die inhibierend auf die unter ihnen gelegenen Pyramidenzellen des Stratum pyramidale wirken. Die Apikaldendriten der Pyramidenzellen reichen in die nächste Schicht, der Stratum lacunosum molekulare. In der CA3-Region befindet sich eine zusätzliche Schicht, das Stratum lucidum, in der die Moosfasern des Gyrus dentatus verlaufen. Der Gyrus dentatus besteht aus 5 Schichten. Im Inneren befindet sich der Hilus, der vorwiegend aus Mooszellen besteht, deren Axone auf der ipsi- und kontralateralen Seite des Hippocampus die innere molekulare Schicht bilden. Zwischen dem Hilus und der inneren molekularen Schicht befindet sich das dichte Band der Körnerzellen. Die Körnerzellen projizieren ihre Dendriten in die äußere molekulare Schicht, wo sie mit Fasern aus dem entorhinalen Kortex in Kontakt treten. Die Axone der Körnerzellen werden als Moosfasern bezeichnet, diese projizieren im Stratum lucidum auf die Pyramidenzellen der CA3-Region. (Abbildung 6A)

Die Signalweiterleitung im Hippocampus vollzieht sich auf 4 Hauptsignalwegen. Über den „Perforant pathway“ gelangen Informationen aus dem entorhinalen Kortex in den Hippocampus. Axone aus dem entorhinalen Kortex projizieren zum Großteil auf die Dendriten der Körnerzellen auf der äußeren molekularen Schicht des Gyrus dentatus. Ein Teil verläuft aber auch direkt auf Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region und auf Pyramidenzellen der CA1-Region. Im „Mossy fibre pathway“ projizieren dann die Körnerzellen des Gyrus dentatus mit ihren Axonen, den Moosfasern ebenfalls auf die Pyramidenzellen der CA3-Region. Die Axone der Pyramidenzellen der CA3-Region

verzweigen sich und senden zum einen Schaffer Kollaterale in die CA1-Regionen beider Hemisphären und zum anderen werden direkt höhere Hirnregionen angesteuert. Die Pyramidenzellen der CA1-Region leiten das Signal zum Subikulum weiter, von wo es dann wieder zum entorhinalen Kortex gelangt. Dieser zirkuläre Signalweg ist bei der Weiterleitung von LTPs („Long-term potentials“) von entscheidender Bedeutung und spielt unter anderem bei der Speicherung von Informationen im Langzeitgedächtnis eine zentrale Rolle. (Abbildung 6B).

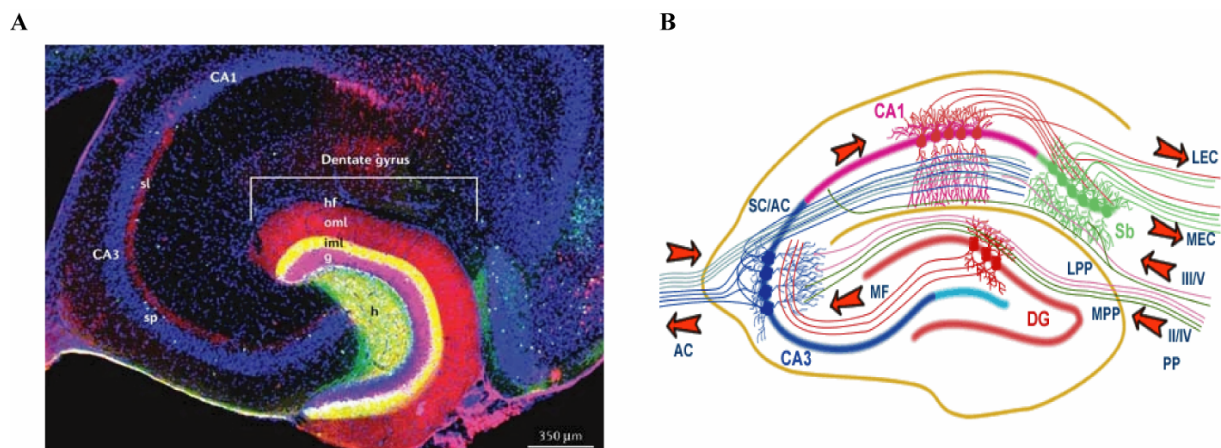


Abbildung 6: Aufbau und Signalwege des Hippocampus. A, Die verschiedenen Schichten des Hippocampus, sämtliche Nuclei sind blau gefärbt. Es sind deutlich die Pyramidenzellen der CA-Regionen (CA1, CA3) erkennbar. Körnerzellen sind rot gefärbt. Erkennbar ist die durch die Dendriten der Körnerzellen rot gefärbte, breite äußere molekulare Schicht (oml), die rot gefärbten Moosfasern der Körnerzellen unterhalb der CA3-Region (sl) und in Pink die Färbung der Zellkörper der Körnerzellen im Gyrus dentatus (g), die sich aufgrund der Überlagerung der blau gefärbten Nuclei und der roten Körnerzellen ergibt. In grün sind die Mooszellen der Hilus-Region gefärbt (h). Ihre Axone verlaufen in der inneren molekularen Schicht (iml), erscheinen dort aber aufgrund der Überlagerung mit den rot gefärbten Dendriten der Körnerzellen in gelb (iml). B, Die Signalwege des Hippocampus. Der Informationseingang erfolgt über den entorhinalen Kortex (EC), der über den „Perforant pathway“ (PP, aufgeteilt in lateralen PP und medialen PP) eine Verbindung zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus und Pyramidalneuronen der CA3-Region bildet. Die Pyramidenzellen der CA3-Region sind außerdem mit den Moosfasern der Körnerzellen des Gyrus dentatus in Verbindung. Die Pyramidenzellen senden Axone in übergeordnete Kortexregionen und kontaktieren sowohl über die Schaffer-Kollaterale (SC) Pyramidalneurone der CA1-Region des ipsilateralen, als auch über den „Associational Commissural pathway“ (AC) Pyramidalneurone der CA1-Region des kontralateralen Hippocampus. Diese CA1-Neurone können auch direkt Informationen aus dem PP erhalten und senden ihre Axone zu den Neuronen des Subikulums, die die Information wiederum zum EC weiterleiten (www.bristol.ac.uk).

1.7. Die axonale und dendritische Entwicklung hippocampaler Neurone und zugrundeliegende Signalmechanismen

Semaphorine und Plexine können wie in Kapitel 1.5 beschrieben verschiedene GTPasen und Signalwege aktivieren. Wie sich hippocampale Neurone in Kultur entwickeln und inwiefern diese Signalwege bei der Entwicklung von Neuronen involviert sind, soll in diesem Kapitel diskutiert werden.

1.7.1. Entstehung von Neuriten

Bei der Entwicklung von Neuriten spielen GTPasen eine wichtige Rolle. Eine Rac- und Cdc42-Aktivierung führt zu einer gesteigerten Formation von Neuriten, eine Aktivierung von RhoA hat einen entgegengesetzten Effekt. Dieser Effekt ist in einer Vielzahl von neuronalen Zelllinien und primären Zellsystemen beschrieben worden (112). Außerdem ist in einer Zellkultur von hippocampalen Neuronen gezeigt worden, dass konstitutiv-aktives Rac1 das Wachstum von Neuriten fördert und dass die Expression von einem dominant-negativen Rac1-Konstrukt zu einem verminderten Neuritenwachstum führt (113). Konstitutiv aktives RhoA hingegen verhindert die Bildung von Neuriten in primären hippocampalen Neuronen (113, 114) und eine RhoA-Inhibition führt zu einem gesteigerten Neuritenwachstum (114-117). RhoA ist für die Retraktion von Neuriten von Bedeutung. Retraktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Neuausrichtung von neuronalen Fortsätzen, die bei der Wegleitung („guidance“), von Neuriten oder bei der Plastizität von Synapsen auftreten.

1.7.2. Neuronale Polarisation

Neuronen besitzen eine polarisierte Struktur, die eine gerichtete Weiterleitung von Informationen ermöglicht. Sie haben typischerweise mehrere Dendriten, die Informationen von präsynaptischen Neuronen erhalten und ein Axon, das die Information zu postsynaptischen Neuronen weiterleitet. Die Entwicklung dieser spezifischen Fortsätze gliedert sich in 5 Stadien. Nach dem Ausplattieren adhären die runden Neuronen auf dem Substrat und formen ein Lamellipodium (Stadium 1), das innerhalb kurzer Zeit von mehreren kleinen Neuriten durchbrochen wird (Stadium 2). An der Spitze eines jeden Neuriten befindet sich ein Wachstumskegel, die Neuriten elongieren und retrahieren, ohne an Länge zu gewinnen. Innerhalb von 24 Std. beginnt einer der Fortsätze rapide in die Länge zu wachsen,

um das Axon auszubilden (Stadium 3). Nach mehreren Tagen beginnen auch die verbliebenen Neuriten in die Länge zu wachsen und sich zu verzweigen (Stadium 4). Im weiteren Verlauf gewinnt das Axon an Länge, die Dendriten verzweigen sich weiter und formen entlang ihres Schaftes kleine Fortsätze „Spines“, über die synaptische Kontakte ausgebildet werden (118-121).






| Stadium: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------|---|---|---|---|---|
| | Lamellipodia | Kleinere Fortsätze | Axonales Wachstum | Dendritisches Wachstum | Maturation |
| |  |  |  |  |  |
| Tage in Kultur: | 0.25 | 0.5 | 1.5 | 4 | >7 |

Abbildung 6: Stadien neuronaler Entwicklung von hippocampalen Neuronen (118, modifiziert) Hippocampale Neurone in Kultur formen ein Lamellipodium, nachdem sie auf dem Substrat adhäreren (Stadium 1) und beginnen kurz darauf erste Fortsätze zu entwickeln (Stadium 2). Am folgenden Tag wächst einer der Neuriten mit einem vergrößerten Wachstumskegel in die Länge (Stadium 3). In den nachfolgenden Tagen beginnen die verbleibenden Neuriten in die Länge zu wachsen, sich zu verzweigen und formen Dendriten (Stadium 4). In einem letzten Schritt entwickeln sich Axon und Dendriten weiter und die Dendriten bilden kleine Fortsätze „Spines“ aus (Stadium 5).

1.7.3. Axonale Entwicklung

In einem frühen Stadium der axonalen Entwicklung spielt Cdc42, als Effektor von der GTPase Rap1B eine wichtige Rolle. Rap1B wird lokal begrenzt an der Spitze eines Neuriten exprimiert, kurz bevor sich der Neurit zu einem Axon entwickelt. Es ist außerdem gezeigt worden, dass sowohl die Expression von einem konstitutiv aktiven Rap1B Mutanten, als auch von einem aktiven Cdc42 Mutanten zu einer erhöhten Ausbildung von Axonen führt. Ein „Knockdown“ beider GTPasen mittels shRNA führt hingegen zu einem Verlust der Polarität (113). Für CRMP-2, dem „collapsin response mediator protein-2“, ein Substrat der Rho-Kinase, ist ebenfalls eine fördernde Wirkung auf die Ausbildung von Axonen nachgewiesen worden. Die Überexpression von CRMP-2 führt zur Entwicklung von multiplen Axonen und zur einer Transformation von voll entwickelten Dendriten zu Axonen (122). CRMP-2

inhibiert Rho Signalwege (121, 123, 124) und die Phosphorylierung von CRMP-2 durch Rho-Kinase inhibiert CRMP-2 (121). CRMP-2 kann auch GTPasen-unabhängig durch GSK-3beta phosphoryliert und inaktiviert werden, GSK-3beta wiederum kann durch den PI3K-Signalweg phosphoryliert und inaktiviert werden (125).

Im weiteren Verlauf der axonalen Entwicklung nimmt das Axon an Länge zu und beginnt sich zu verzweigen. In diesem Stadium fördern Rac1 und Cdc42 diese Prozesse. In Kulturen aus kortikalen Zellen der Ratte führt die Expression von dominant-negativen Rac1- und Cdc42-Konstrukten zu einem verminderten axonalen Wachstum (126). Für die Rolle der GTPase RhoA sind kontroverse Effekte festgestellt worden. Zum einen fördert p190 RhoGAP die axonale Entwicklung über eine Inhibierung von RhoA (127, 128), zum anderen führt die Expression von dominant-negativem RhoA zu einer Reduzierung der axonalen Länge und Verzweigung (129). Das Rho GTPasen ihre Effekte nicht nach dem alles-oder-nichts Prinzip vermitteln, zeigt die Tatsache, dass SDF-1alpha in Abhängigkeit der Konzentration an GTP-gebundenem RhoA unterschiedliche Effektoren aktivieren kann. In Gegenwart geringer Konzentrationen an GTP-RhoA vermittelt SDF1alpha ein gesteigertes axonales Wachstum über einen Rho/mDia Signalweg, in Gegenwart hoher Konzentrationen inhibiert SDF1alpha das Wachstum und die Entwicklung von Neuronen über einen Rho/Rho-kinase Signalweg (130, 131). Unter normalen Bedingungen hängt die Aktivierung von Rho GTPasen von dem örtlichen und zeitlichen Auftreten spezieller Rho GTPasen Regulatoren ab. Die feine Balance dieser Regulatoren bestimmt die lokale Rho GTPasen-Aktivität. Zudem bestimmt das Ausmaß der Aktivierung mit welchem Effektor die Rho GTPase interagiert. Neben der axonalen Zielführung sind einige Semaphorine auch an der axonalen Entwicklung beteiligt. So besitzt das Semaphorin 3A neben seiner repulsiven Wirkung auf axonale Wachstumskegel (Kapitel 1.2.1) eine inhibitorische Wirkung auf das axonale Längewachstum (132) und auf axonale Verzweigungen (133).

1.7.4. Dendritische Entwicklung

Nach der Elongation des Axons in Stadium 3 (Abbildung 6) erfolgt das Längenwachstum und die Verzweigung der Dendriten. Es bildet sich eine komplexe, verzweigte Struktur aus. Während ihrer Entwicklung entstehen und retrahieren ständig kleine Fortsätze, Filopodien, entlang des Schafts. Einige dieser Fortsätze stabilisieren sich und gewinnen an Länge. Diese neuen dendritischen Fortsätze bestehen zunächst nur aus Aktin. Mit der vermehrten Einlagerung von Mikrotubuli erfolgt die Stabilisation. Ausgewachsene Dendriten bestehen

zum größten Teil aus Mikrotubuli mit einem nahe der Zellmembran gelegenen Aktingerüst (112, 134, 135). Zu den Mediatoren, die dendritisches Wachstum vermitteln, zählen diffusionsfähige Proteine, wie Neurotrophine, Semaphorine und Slits, Zell-Zellkontakt-vermittelnde Proteine wie Notch-1 und β -Catenin und neuronale Aktivität (134, 136-138).

Rho GTPasen spielen bei der Reorganisation des Zytoskeletts eine entscheidende Rolle und sind daher auch für die Dendritenentwicklung von Bedeutung. Die Aktivität von RhoA hat einen starken inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung von Dendriten. Konstitutiv-aktives RhoA führt zu einer drastischen Abnahme der Dendritenentwicklung von Pyramidalneuronen organotypischer hippocampaler Schnitte der Ratte (139) und kultivierter hippocampaler Neurone von Maus und Ratte (129, 140). Dominant-negatives RhoA erhöht signifikant die Dendritenlänge von hippocampalen Neuronen der Maus in Kultur (129), wohingegen in organotypischen hippocampalen Schnitten der Ratte kein Effekt auf die Dendritenmorphologie festgestellt werden kann. Möglicherweise ist RhoA unter physiologischen Bedingungen nur in einem geringen Maße aktiv um dendritisches Wachstum zu ermöglichen und wird dann bei Bedarf lokal aktiviert um dendritisches Wachstum zu begrenzen (139). Bei Rac handelt es sich um einen positiven Regulator dendritischen Wachstums. Dominant-negatives Rac1 führt zu einer verminderten Anzahl an Dendriten kultivierter kortikaler Pyramidalneuronen von Maus (141) und Ratte (126). Die Expression von konstitutiv-aktivem Rac1 führt zu einem gegensätzlichen Effekt (126). Experimente mit einem „Time-lapse imaging“ System zeigen, dass Rac1 das Wachstum und die Ausbildung von Dendriten über die Beeinflussung der Fluktuation von Retraktionen und Elongationen beeinflusst. Konstitutiv-aktives Rac1 führt zu einer erhöhten Ausbildung dendritischer Verzweigungen und zu einer erhöhten Retraktion, dominant-negatives Rac1 führt einzig zu einer erhöhten Retraktion von Dendriten (142). Die Beeinflussung erfolgt über die Verzweigungsdynamik. In organotypischen hippocampalen Schnitten kann kein Effekt von konstitutiv-aktivem oder dominant-negativem Rac1 auf die dendritischen Verzweigungen von Pyramidalneuronen festgestellt werden (139).

Neben den GTPasen spielen eine Vielzahl weiterer Regulatoren eine Rolle bei der Entwicklung von Dendriten. Den nachfolgenden Signalwegen ist insbesondere Beachtung zu schenken, da sie sich mit Plexin-vermittelten Signalwegen überschneiden. Für den Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF ist in organotypischen kortikalen Schnitten gezeigt worden, dass eine exogene Applikation zu einer vermehrten Dendritenausbildung führt und dass die Inhibierung von Met, dem HGF-Rezeptor, durch Met-Antikörper oder durch die Expression eines dominant-negativen Met-Konstrukts in einem verminderten Dendritenwachstum resultiert

(143). Met und HGF werden von Neuronen der CA1-Region des Hippocampus exprimiert (144, 145). Weiterhin ist festgestellt worden, dass in hippocampalen Kulturen die koordinierte Aktivierung des Ras-PI3K-Akt-mTOR- und Ras-MAPK-Signalwegs zu einer Zunahme der dendritischen Komplexität führt (146). Doch auch aus einer alleinigen Aktivierung des PI3K-Akt-mTOR Signalwegs resultiert ein erhöhtes Wachstum und eine erhöhte Verzweigung von Dendriten hippocampaler Neurone (147). Die Aktivierung des PI3K-, als auch der MAPK-Signalwegs über BDNF führt zu einer Erhöhung der Dendritenanzahl (148).

1.7.5. Ausbildung von Synapsen und Spines

Im Stadium 2 (Abbildung 6) der neuronalen Entwicklung wird bereits ein Großteil der synaptischen Komponenten in hippocampalen Neuronen exprimiert. Glutamatrezeptoren, Glutamattransporter und Calciumkanäle sind gleichmäßig über die neuronale Membran verteilt (149-151). Mit Erreichen von Stadium 3 erfolgt die Einlagerung von synaptischen Vesikeln in das entstehende Axon. In Stadium 4 ist bereits die Kompartimentierung sämtlicher synaptischer Komponenten etabliert. Glutamatrezeptoren, Glutamattransporter, N-Typ Calciumkanäle befinden sich in der somatodendritischen Region (149, 150) und die synaptischen Vesikel befinden sich selektiv im Axon (152, 153). Wenn der synaptische Kontakt geformt wird, kommt es zu einem „clustering“ der synaptischen Vesikel am präsynaptischen Ende (152, 153). Zur gleichen Zeit erfolgt eine Anreicherung von Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Membran (149, 150).

Einige Neuronen entwickeln Spines, entlang ihrer Dendriten. An ihren Enden befindet sich der Großteil der exzitatorischen Synapsen des Gehirns. Diese Spines sind sehr beweglich und heterogen in Form und Größe. Unreife Fortsätze werden als Filopodien bezeichnet, diese sind von länglicher, schmaler Form. Vollentwickelte Fortsätze, Spines, haben eine typische Kopf- und Nackenstruktur (154, 155). Das Zytoskelett von Filopodien und Spines basiert zum großen Teil auf Aktin und Rho GTPasen spielen eine wichtige Rolle in ihrer Formation, Erhaltung und Physiologie. Generell fördert eine Aktivierung von Rac und Cdc42 die Ausbildung von Spines, während eine Aktivierung von Rho und Rho-kinase zum Verlust von Spines führt (112). Die Rho GTPase Rnd1 ist ebenfalls bei der Ausbildung von Spines beteiligt. Die Expression von Rnd1 in Kulturen von hippocampalen Neuronen der Ratte führt zu einer Verlängerung der Spines, ein Knock-down resultiert in einer erhöhten Anzahl kopfloser Fortsätze, in einer reduzierten Spinelänge und Spineanzahl (156).

Eine direkte Beteiligung von Semaphorinen bei der Entwicklung von Spines kann für Sema3A und Sema4D nachgewiesen werden. Die Sema3A-Applikation auf Kulturen kortikaler Neurone führt zu einem „clustering“ von PSD-95 („postsynaptic density-95“) und Synapsin an der Synapse. Sema3A Knockout-Mäuse zeigen außerdem eine verminderte Dichte synaptischer Boutons (157). Kürzlich ist gezeigt worden, dass die Sema3A-induzierte Spineentwicklung einer cdk5 („cyclin dependent kinase 5“)-vermittelten Phosphorylierung von CRMP1 abhängt (158). Für Sema4D ist bei kultivierten hippocampalen Neuronen ebenfalls ein für die Spineentwicklung fördernder Effekt beschrieben. Die Applikation von Sema4D führt zu einer Aktivierung von RhoA, einer Erhöhung der Spinedichte und Änderungen in der Spineform. Diese Effekte können durch die Behandlung der Neurone mit Y-27632, einem Rho-Kinase-Inhibitor geblockt werden (159).

1.8. Ziel der Studie

Semaphorine und ihre transmembranären Rezeptoren, Plexine, sind wichtige Regulatoren bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Organogenese, Angiogenese, des invasiven Wachstums und der Apoptose (21, 160). In sich entwickelnden neuronalen Systemen werden sie klassischerweise mit der axonalen Navigation, bei der sie in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen und des Neuronentypus entweder retrahierend oder attrahierend wirken (161). So wird auch Sema4D mit einer auf axonale Wachstumskegel kurzzeitig repulsiven Wirkung in Verbindung gebracht, die über Plexin-B1 vermittelt wird und bei der sowohl die Aktivierung von RhoA und den Rezeptortyrosinkinasen ErbB-2 und Met, als auch eine Inhibition von R-Ras von Bedeutung sind (96, 100).

Diese Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Rolle von Sema4D und den B-Plexinen bei der Entwicklung der Zytoarchitektur hippocampaler Neurone eingehender zu untersuchen. Neben den akuten Sema4D-Effekten auf die Wachstumskegel von Neuronen lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Studien über die Zusammenhänge von Sema4D und B-Plexinen auf die axonale oder dendritische Entwicklung und Morphologie vor. Insbesondere sollten folgende Punkte eingehender untersucht werden:

1. Welche Bedeutung hat das Expressionsmuster von Sema4D und den B-Plexinen für die Entwicklung hippocampaler Neurone?
2. Welchen Beitrag leisten die diversen Signalwege der B-Plexine bei der Entwicklung?
3. Wie entwickeln sich die Neurone von Knockout-Mäusen der jeweiligen B-Plexine?

2. Material

2.1. Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--|----------------------------|
| Acrylamid 40%, Mischung 37,5:1 | Roth, Karlsruhe |
| Agar-Agar | Applichem, Darmstadt |
| Agarose | Invitrogen, Karlsruhe |
| Ammoniumacetat | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid | Applichem, Darmstadt |
| Ammoniumpersulfat | Applichem, Darmstadt |
| Ampicillin Natriumsalz | Applichem, Darmstadt |
| Aprotinin | Applichem, Darmstadt |
| ATP-Lösung | Ambion, Cambridgeshire, UK |
| B27-Supplement | Invitrogen, Karlsruhe |
| BES | Applichem, Darmstadt |
| BME | Invitrogen, Karlsruhe |
| Bromophenolblau Natriumsalz | Sigma, Schnelldorf |
| BSA (bovine serum albumin) | ICN Biomedicals, Ohio |
| Calciumchlorid | Applichem, Darmstadt |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe |
| Coomassie Blau | Sigma, Schnelldorf |
| Cytochalasin B | Sigma, Schnelldorf |
| Dichlormethan | Merck, Darmstadt |
| DiI | Invitrogen, Karlsruhe |
| DMEM | Invitrogen, Karlsruhe |
| Diethanolamin | Merck, Darmstadt |
| Dimethylformamid | Merck, Darmstadt |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) für Zellkultur | Sigma, Schnelldorf |
| dNTP- Mischung | Roth, Karlsruhe |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | Applichem, Darmstadt |
| Ethanol, absolut | Applichem, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Merck, Darmstadt |
| FBS (fetal bovine serum) | Invitrogen, Karlsruhe |
| FCS (fetal calf serum) | Invitrogen, Karlsruhe |

| | |
|-----------------------------|-----------------------|
| Ficoll 400 | Sigma, Schnelldorf |
| Glucose | Applichem, Darmstadt |
| Glutamin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Glycerol | Merck, Darmstadt |
| Glycin | Sigma, Schnelldorf |
| GMEM | Sigma, Schnelldorf |
| Goat Serum | Invitrogen, Karlsruhe |
| GS supplement 50x | Sigma, Schnelldorf |
| HBSS | Invitrogen, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | Applichem, Darmstadt |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Hoechst 33342 (Dapi) | Molecular Probe |
| Horse Serum | Invitrogen, Karlsruhe |
| Imidazol | Sigma, Schnelldorf |
| Isoamylalkohol | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | Applichem, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Applichem, Darmstadt |
| Kaliumhexacyanoferrat (II) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhexacyanoferrat (III) | Sigma, Schnelldorf |
| Kaliumhydroxid | Applichem, Darmstadt |
| Kanamycin | Applichem, Darmstadt |
| Leupeptin | Applichem, Darmstadt |
| L-Homoarginine | Sigma, Schnelldorf |
| L-Methionin Sulfoximin | Sigma, Schnelldorf |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat | Applichem, Darmstadt |
| Methanol | Applichem, Darmstadt |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma, Schnelldorf |
| Mineralöl | Sigma, Schnelldorf |
| Mowiol 40-88 | Sigma, Schnelldorf |
| Natriumacetat | Roth, Karlsruhe |
| Natriumazid | Sigma, Schnelldorf |
| Natriumchlorid | Applichem, Darmstadt |

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| Natriumdihydrogenphosphat | Applichem, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat | Applichem, Darmstadt |
| Natriumhydroxid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumorthovanadat | Sigma, Schnelldorf |
| NBT/ BCIP Lösung | Roche, Mannheim |
| Ni-NTA Agarose | Qiagen, Hilden |
| p-Nitrophenylphosphat | Sigma, Schnelldorf |
| Nonidet P40 | Applichem, Darmstadt |
| Paraformaldehyd | Applichem, Darmstadt |
| PBS (für Zellkultur) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin/ Streptomycin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Pepstatin A | Applichem, Darmstadt |
| Phalloidin-TRITC (1:200) | Sigma, Schnelldorf |
| Phenol | Roth, Karlsruhe |
| Poly L-Lysine Hydrombromid | Sigma, Schnelldorf |
| Ponceau S | Applichem, Darmstadt |
| Proteinase K | Applichem, Darmstadt |
| Roti-Quant | Roth, Karlsruhe |
| Rotiphorese Gel 30 | Roth, Karlsruhe |
| SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) | Applichem, Darmstadt |
| TEMED (Tetramethylethylendiamin) | Applichem, Darmstadt |
| Tetrazyclin | Sigma, Schnelldorf |
| Triton X-100 | Applichem, Darmstadt |
| Trockenmilch | Applichem, Darmstadt |
| Trypsin/ EDTA | Invitrogen, Karlsruhe |
| X-Gal | Peqlab, Erlangen |

2.2. Antikörper

| | | |
|-------|------------------|------------------------------|
| goat | anti-mouse-FITC | Dianova, Hamburg |
| goat | anti-mouse-TRITC | Dianova, Hamburg |
| goat | anti-mouse-HRP | Amersham-Bio, Freiburg |
| goat | anti-rabbit-HRP | Sigma, Schnelldorf |
| mouse | anti-Calbindin | Chemicon, Temecula, CA |
| mouse | anti-c-Myc | Santa Cruz Biotechnology, HD |

| | | |
|--------|------------------------------------|-------------------------------|
| mouse | anti -MAP2 | Sigma, Schnelldorf |
| mouse | anti -NeuN | Chemicon, Temecula, CA |
| mouse | anti -Synaptophysin | Chemicon, Temecula, CA |
| mouse | anti -Tau-1 | Chemicon, Temecula, CA |
| mouse | anti -VSV | Sigma, Schnelldorf |
| rabbit | anti -FLAG | Sigma, Schnelldorf |
| rabbit | anti -Calretinin | Chemicon, Temecula, CA |
| rabbit | anti -GFAP | Dako,High Wycombe, UK |
| rabbit | anti -His(6) | Abcam, Cambridgeshire, UK |
| rabbit | anti -GFP | Invitrogen, Karlsruhe |
| rabbit | anti -GSK-3beta | Chemicon, Temecula, CA |
| rabbit | anti -GSK-3beta [pS ⁹] | Biosource, Camarillo, CA |
| rabbit | anti -mTOR | Cell Signaling, Danvers, MA |
| rabbit | anti -phospho-mTOR (Ser2448) | Cell Signaling, Danvers, MA |
| rabbit | anti-Sema4D | Shinobo Inagaki, Aichi, Japan |
| rat | anti -Tubulin | Chemicon, Temecula, CA |

2.3. Inhibitoren und Wachstumsfaktoren

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Rapamycin (FRAP/mTOR Inhibitor) | Cell Signaling, Danvers, MA |
| EGF, Epidermal Growth Factor | Sigma, Schnelldorf |
| LiCl | Sigma, Schnelldorf |
| LY-27632 | Yoshitomi Ind., Saitama, Japan |
| PD98059 | Cell Signaling, Danvers, MA |
| LY294002 (PI3K-Inhibitor) | Merck, Darmstadt |
| K-252a | Merck, Darmstadt |
| AG825 | Merck, Darmstadt |

2.4. DNS- und Proteinmarker

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| PageRuler prestained protein ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Smart- Ladder | Eurogentec, Seraing, Belgien |

2.5. Reagenziensysteme und Kits

| | |
|------------------------------------|------------------------|
| Immoblion Western, HRP-Substrate | Millipore, Danvers, MA |
| Nucleobond PC-500 Plasmid Maxi Kit | Macherey-Nagel, Düren |
| Serva Silverstain Kit | Serva, Heidelberg |
| Vectastain ABC Elite Kit | Vector Labs, Grünberg |
| DIG RNA Labelling Kit | Roche, Mannheim |
| DIG Wash and Block Buffer Set | Roche, Mannheim |

2.6. Plasmide und Vektoren

| | |
|------------------------|--------------------------------------|
| Sema4D-AP-His | Luca Tamagnone, Universität Turin |
| pcDNA3 | Invitrogen, Karlsruhe |
| pEGFP-N1 | Clontech, Mountain View, USA |
| FLAG-PDZ RhoGEF | S. Kubick, Kazusa |
| VSV-Plexin-B1 | Luca Tamagnone, Universität Turin |
| Myc-RhoA | Antje Gohla, Universität Düsseldorf |
| dn-Plexin-B2 Konstrukt | Alexandra Hirschberg, Universität HD |

2.7. Bakterienstämme und Zelllinien

| | |
|--|---|
| DH5 α | Genotyp: <i>F- ϕ80lacZ.M15. (fvlacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \ddot{e}-</i> Invitrogen, Karlsruhe |
| DH10B | Genotyp: <i>F- mcrA. (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZ.M15 .lacX74 recA1 endA1 araD139. (ara, leu)7697 galU galK \ddot{e}- rpsL nupG</i> Invitrogen, Karlsruhe |
| HEK293 | American Type Cell Culture Collection |
| Lec3.2.8.1 CHO, stabil Sema4D exprimierend | E. Yvonne Jones, Universität Oxford |

2.8. Verwendete Ratten- und Mauslinien

Tabelle 1: Verwendete Mauslinien

| <i>Name</i> | <i>Bemerkung</i> |
|-------------------------------|--|
| Wistar | Wildtyp Rattenlinie, Charles River, Sulzfeld |
| plxnb1 ^{-/-} C57BL/6 | Klassische Plexin-B1 Knockout-Linie, C56Bl6 Hintergrund, Suhua Deng, Universität Heidelberg |
| plxnb2 ^{-/-} C57BL/6 | Klassische Plexin-B2 Knockout-Linie, C57BL/6 Hintergrund, Suhua Deng, Universität Heidelberg |
| plxnb2 ^{-/-} CD1 | Klassische Plexin-B2 Knockout-Mauslinie, CD1 Hintergrund, Suhua Deng, Universität Heidelberg |
| plxnb2lacZ/+ | Heterozygote Plexin-B2 Knock-in-Mauslinie, enthalten cDNS für β -Galaktosidase im Plexin-B2 Genlokus. Roland Friedel, GSF München |

2.9. Oligonukleotide

2.9.1. Primer für Genotypisierungen

| | |
|------------|-----------------------------------|
| PB1AG1 | 5'-GTC CAT GTG GAA CGC GAA G-3' |
| PB1SAS1 | 5'-GCT GGG TCC TGA AGG CTG-3' |
| PB1AG2 | 5'-CCA GGT GTG TTT GCC TAT CC-3' |
| PB1SLOXPAS | 5'-TGG CTC TTC AAC AGT CCT TCC-3' |
| PB2AG | 5'-ATA CGA GCC TTT GAG CCA TTG-3' |
| B_Lox_Seq | 5'-GGG CTC AGC GAT GAC AAC C-3' |
| C_Lox_Seq | 5'-CCT CAT GCA CGT CAT TCG TC-3' |

2.9.2. Primer für *in-situ*-Hybridisierungen

| | |
|------------------|---|
| PB1sense04 | 5'-CCT CCG AGA GGC TCC AGA TGC T-3' |
| PB1antisense04 | 5'-GCA GTG CCA TCC TCC AGG-3' |
| PB2sense04 | 5'-CAA GCG GCG GCA GAA GCG AGA-3' |
| PB2antisense04 | 5'-ATC TGC TGT AGG CGG AAG GCC AG-3' |
| CD100sense01 | 5'-GCC TAG CTT CGT CTT TGC TGA CGT G-3' |
| CD100antisense01 | 5'-CGA AGA CAG AGG GGC ATG GGC-3' |

2.10. Enzyme

| | |
|---------------------------|--------------------------------|
| Proteinase K | Applichem, Darmstadt |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs, Frankfurt |
| Taq-Polymerase | Invitrogen, Karlsruhe |

2.11. Filter und Membranen

| | |
|---|------------------------|
| Blotting-Papier | NeoLab, Heidelberg |
| Millicell Plate Insert | Millipore, Danvers, MA |
| Nalgene Filtereinheiten, 1000ml | Nalge, Hereford, UK |
| Protran Nitrozellulose Transfer Membran | Whatman, Dassel |
| Centricon Plus-20, 100k | Millipore, Danvers, MA |

2.12. Zubehör für die PDS1000 Genkanone

| | |
|---------------------------|------------------------|
| 1.6 Micron Gold | Bio-Rad, Hercules CA |
| Rupture Disks, 1100 PSI | Bio-Rad, Hercules CA |
| Microcarrier | Bio-Rad, Hercules CA |
| Stopping Screens | Bio-Rad, Hercules CA |
| Cell Strainer, 70µm Nylon | BD Falcon, Bedford, MA |

2.13. Pufferansätze und Lösungen

Tabelle 2: Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Pufferansätze und Lösungen

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> | <i>Endkonzentration</i> | <i>Bemerkungen</i> |
|--------------------------------|--|--|----------------------------|
| AP-Reaktionspuffer | Tris-HCl NaCl MgCl ₂ | 100 mM 100 mM 50 mM | pH 9,5, mit HCl einstellen |
| AP-Färbepuffer | BCIP NBT In AP-Reaktionspuffer | 0,177 mg/ ml 0,33 mg/ ml | |
| BBS (2x) | BES NaCl Na ₂ HPO ₄ | 0,05 M 0,28 M 0,0015 M | |
| β-Galaktosidase Färbelösung | EGTA K ₄ [Fe(CN) ₆] K ₃ [Fe(CN) ₆] MgCl ₂ Na-Desoxycholat NP-40 X-Gal Na-Phosphat-Puffer | 5 mM 5 mM 5 mM 2 mM 0,01 % w/v 0,02 % v/v 1 mg/ ml 100 mM | |
| β-Galaktosidase Waschlösung | EGTA MgCl ₂ Na-Desoxycholat NP-40 Na-Phosphatpuffer | 5 mM 2 mM 0,01 % w/v 0,02 % v/v 100 mM | |
| Blockierungspuffer (ISH) | Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer | 10% 1x | |
| Detektionspuffer (ISH) | Tris pH 9,5 NaCl MgCl ₂ | 100 mM 100 mM 50 mM | |

Fortsetzung Tabelle 2: Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Pufferansätze und Lösungen

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> | <i>Endkonzentration</i> | <i>Bemerkungen</i> |
|--------------------------------|--|---|--------------------------------|
| DNS-Ladepuffer (10x) | Ficoll 400 Tris pH 7,6 Bromphenolblau Xylencyanol FF | 15 % 50 mM 0,25 % 0,25 % | |
| Elutionslösung | Tris pH 8,0 NaCl Imidazol | 10 mM 500 mM 500 mM | |
| HBHA-Puffer | BSA NaN ₃ HEPES in HBSS | 0,5 mg/ ml 0,1 % (w/v) 20 mM | pH 7,0, mit HCl einstellen |
| HEPES/ PBS/ Glucose-Lösung | Glucose HEPES PBS | 6g 7,38 g ad 1000 ml | - sterilfiltrieren, pH 7,38 |
| Hybridisierungspuffer (ISH) | Formamid Blocking-Reagenz N-Lauroylsarcosin SDS SSC | 50 % 2 % 0,1 % 0,02 % 5x | |
| Krebs- Lösung | NaCl 5 M KCl 1 M MgSO ₄ 1 M NaHCO ₃ 1 M NaH ₂ PO ₄ 0,2 M CaCl ₂ 1 M Glucose 1 M | 24,8 ml/ l 3 ml/ l 1,3 ml/ l 26 ml/ l 6,25 ml/ l 2 ml/ l 10 ml/ l | - sterilfiltrieren, pH 7,38 |
| Laemmli- Puffer | Tris pH 6,8 SDS Glycerol Bromphenolblau 2-Mercaptoethanol | 62,5 mM 2% 10% 0,001% 5% | |

Fortsetzung Tabelle 2: Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Pufferansätze und Lösungen

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> | <i>Endkonzentration</i> | <i>Bemerkungen</i> |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------|
| Laufpuffer (Western Blot) | Tris SDS | 0,25 M 0,2% | pH 6,8 |
| Mowiol® Einbettmedium | Mowiol® 4-88 Glycerol Tris HCl pH 8,5 | 10 % w/v 25 % w/v 0,1 M | |
| Maleinsäurepuffer (10x, ISH) | Maleinsäure NaCl | 1 M 1,5 M | pH 7,5 |
| Na-Phosphatpuffer | NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ | 0,2 M 0,2 M | pH 8,0 |
| P1 | Tris EDTA pH 8,0 RNaseA | 50 mM 10 mM 0,1 mg/ ml | |
| P2 | NaOH SDS | 0,2 M 1 % | |
| P3 | Kaliumacetat | 3 M | pH 5,5 |
| Paraformaldehyd | PFA in PBS | 4 % w/v | auf pH 8,0 mit NaOH einstellen |
| PBS (10x) | NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ | 137 mM 2,7 mM 8 mM 1,5 mM | |
| pNPP-Puffer | para-Nitrophenylphosphat in SEAP-Puffer | 120 mM 1x | |
| Poly-L-Lysin Lösung | Poly-L-Lysin 0,1 M Borsäure | 5 mg 50 ml | pH 8,5 |
| Ponceau S | Ponceau S KOH | 0,25% 10% | |
| Proteingel-Färbelösung | Coomassie Blau Methanol Essigsäure H ₂ O | 1,2 g 300 ml 60 ml ad 500 ml | |

Fortsetzung Tabelle 2: Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Pufferansätze und Lösungen

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> | <i>Endkonzentration</i> | <i>Bemerkungen</i> |
|-----------------------------------|---|---|--|
| Proteingel- Entfärbelösung | Methanol Essigsäure H ₂ O | 50 ml 50 ml 400 ml | |
| RIPA (4x) | NaCl Tris pH 7,4 EDTA pH 8,0 Triton-X-100 SDS Deoxycholat Aprotinin Leupeptin AEBSF Pepstatin A Na ₃ VO ₄ | 150 mM 50 mM 5 mM 1% (v/v) 0,1 % 0,5 % 1 µg/ ml 1 µg/ ml 0,1 mM 1 µg/ ml 2 mM | |
| RNAseA-Puffer (ISH) | NaCl Tris pH 8,0 EDTA pH 8,0 | 500 mM 10 mM 1 mM | |
| Sammelgelpuffer (Western Blot) | Tris SDS 20% | 30,4 g/ l 10 ml/ l | pH 6,8 |
| SEAP-Puffer (2x) | Diethanolamin MgCl ₂ L-Homoarginine | 1 M 0,5 mM 10 mM | pH 9,8 (mit NaOH einstellen), bei -20°C lagern |
| SSC (20x) | NaCl Na-Citrat | 3 M 0,3 M | pH 7,0 |
| TAE (50x) | Tris EDTA Na-Acetat | 40 mM 1 mM 20 mM | pH 7,8 |
| Tail-Lysepuffer | EDTA Tris pH 8,0 SDS Proteinase K | 10 mM 50 mM 0,5% 0,1 mg/ ml | |

Fortsetzung Tabelle 2: Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Pufferansätze und Lösungen

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> | <i>Endkonzentration</i> | <i>Bemerkungen</i> |
|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| TBS | Tris pH 7,5 NaCl | 10 mM 150 mM | |
| TBST | Tween-20 in TBS | 0,05% 1x | |
| TE (10x) | Tris EDTA | 10 mM 0,1 mM | pH 8,0 |
| Transferpuffer (10x, Western Blot) | Tris SDS Glycin Methanol | 0,25 M 0,01% 192 mM 10% | |
| Trenngelpuffer (Western Blot) | Tris SDS 20% | 90,8g/ l 10ml/ l | pH 8,8 |

2.14. Medien für Bakterienkultur

Tabelle 3: Zusammensetzung der Medien für die Bakterienkultur

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> | <i>Endkonzentration</i> | <i>Bemerkungen</i> |
|-----------------|---|--|--|
| LB- Medium | Trypton Hefeextrakt NaCl | 10 g/ l 5 g/ l 5 g/ l | pH 7,4, bei 121°C und 1bar für 5 Min. dampfsterilisieren |
| LB- Agarplatten | Trypton Hefeextrakt NaCl Agar-Agar | 10 g/ l 5 g/ l 5 g/ l 15 g/ l | bei 121°C und 1bar für 5 Min. dampfsterilisieren |

2.15. Medien für Zellkultur

Tabelle 4: Zusammensetzung der Medien für die Zellkultur

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> |
|---|---|
| CHO-Kulturmedium | GMEM 500 ml FBS 50 ml GS supplement 50x 10 ml L-Methionin Sulfoximin (200 µM) 20,2 mg |
| CHO-Einfriermedium | 70% GMEM mit GS supplement 20% FBS 10% DMSO nach dem Auftauen werden die Zellen 2 Tage ohne L-Methionin Sulfoximin wachsen gelassen |
| HEK- Kulturmedium | FBS 50 ml Glutamin (200 mM) 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml, 10000 µg/ ml) 5 ml ad DMEM 500 ml |
| HEK- Transfektions- medium | FCS 50 ml Glutamin (200 mM) 5 ml ad 500 ml DMEM |
| Hippocampale organotypische Schnitte, Kulturmedium | 50% BME 25% Horse Serum 25% HBSS 4,5mg/ ml Glucose 0,1 mM L-Glutamin 20 U/ ml Penicillin/ Streptomycin |
| neuronale Primärkultur, Ausplattiermedium | FBS 50 ml Glucose 45% 5,5 ml Natriumpyruvat 100 mM Glutaminsäure 25 mM 0,55 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml, 10000 µg/ ml) 5 ml ad 500 ml MEM |

Fortsetzung Tabelle 4: Zusammensetzung der Medien für die Zellkultur

| <i>Name</i> | <i>Komponenten</i> |
|---|--|
| neuronale Primärkultur, NB-Medium | B27 Supplement 10 ml L-Glutamin 200 mM Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml, 10000 µg/ ml) 5 ml ad 500 ml Neurobasalmedium |

FBS wird für sämtliche Medien bei 56°C für 30 Min. hitzeinaktiviert

3. Methoden

3.1. Sterilisation von Lösungen und Glasware

Zellkulturmedien, Lösungen und Laborausüstung wurden bei 121°C/ 1 Bar für 30 Minuten autoklaviert

3.2. Zellkultur

Sämtliche Zellen wurden in Zellinkubatoren bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.1. HEK-Zellen

HEK-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in 10 cm-Zellkulturschalen mit 10 ml HEK-Medium kultiviert. Zum splitten wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, trypsiniert, in einem geeigneten Volumen HEK-Medium mittels Pasteurpipette resuspendiert und auf 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät.

3.2.2. Sema4D-exprimierende Lec3.2.8.1 CHO Zelllinie

Die CHO-Zelllinie wurde nach dem Auftauen zwei Tage in CHO-Kulturmedium ohne L-Methionin Sulfoximin kultiviert. Im Anschluss wurde das Medium durch CHO-Kulturmedium ersetzt und die Zellen in 20 ml Zellkulturschalen weiterkultiviert. Nach 3 Tagen wurde der Sema4D-angereicherte Überstand abgenommen. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in CHO-Einfriermedium.

3.2.3. Primärkultur embryonaler hippocampaler Neurone

Die Entnahme der Hippocampi von Maus und Ratte erfolgte am embryonalen Tag 17 in einer HEPES/ PBS/ Glucose-Lösung. Nach der Entnahme wurden die Hippocampi 15 Min. trypsiniert, dreifach in PBS gewaschen und mittels Pasteurpipetten im Ausplattiermedium dissoziiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung in 24-well-Platten auf Poly-L-Lysin überzogenen Coverslips in Ausplattiermedium. Die Konzentration betrug experimentabhängig 50.000 Zellen/ ml, bzw. 80.000 Zellen/ ml. Nach 4 Std. wurde das gesamte Medium durch

NB-Medium ersetzt. Alle 2 bis 3 Tage wurde die Hälfte des Überstandes durch NB- Medium ersetzt. In Abhängigkeit vom Experiment erfolgte eine Kultivierung von 2, bzw. 21 Tagen. Nach dieser Zeit erfolgte eine 10-minütige Fixierung der Zellen in 4% Paraformaldehyd.

3.2.4. Organotypische hippocampale Kulturen

Die Mausgehirne wurden am postnatalem Tag 5 entnommen und in eine 4°C Carbogen-oxygenierte Krebs-Lösung gegeben. Die Gehirne wurden anschließend in 5% Agar eingebettet und auf einem Vibratom in koronare 350 µm Schnitte geteilt. Die Kultivierung erfolgte auf Millicell®-Membranen in 3 cm Zellkulturschalen in Kulturmedium für hippocampale organotypische Schnitte.

3.3. Applikation von Sema4D, Inhibitoren und Viren

Die Hälfte des Überstandes wurde DIV 3 von den Kulturen abgenommen und mit der dem Experiment entsprechenden Sema4D-Präparation in der entsprechenden Konzentration vermengt. Anschließend wurde der Sema4D-angereicherte Überstand zu dem verbleibenden Überstand in den Platten zurückgeführt.

Bei den Experimenten mit Inhibitoren wurden vor der Sema4D-Zugabe die primären Neuronen im Falle der Inhibitoren Y-27632, AG825, K252a, PD98059, LY294002, LiCl, Rapamycin für 20 Min. und im Falle von PD98059 für 1 Std. vorinkubiert.

Der dominant-negative Plexin-B2-Virus wurde DIV 1 auf die Neuronen unmittelbar nach der Zugebe des NB-Mediums appliziert. Der Virustiter betrug 1×10^7 , es wurde eine 1:5000 Verdünnung eingesetzt, die in einer 30-prozentigen Transfektionsrate resultierte. An DIV 3 wurden die Experimente an den mit Virus-versetzten Neuronen durchgeführt, im Anschluss wurde die Effizienz der Infektion mittels Immunzytochemie überprüft.

3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von DNS wurden photometrisch bestimmt. Der Quotient A260/A280 diente dabei als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Außerdem wurde die ermittelte Konzentration zusätzlich auf einem Agarosegel durch Vergleich der Bandenintensität mit dem Gewichtsstandard kontrolliert.

3.5. Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Die HEK-Zellen wurden auf 10 cm-Petrischalen bis zu 70prozentiger Konfluenz kultiviert. Das HEK-Kulturmedium wurde durch 9 ml HEK-Transfektionsmedium ersetzt. 15 µg der zu transfizierenden DNS wurden in 450 µl H₂O gelöst. 500µl 2xBBS wurden nach kräftigem Schütteln zur Lösung hinzugefügt. Anschließend wurden 50 µl CaCl₂ (2,5 M) tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt, 20 Min. bei RT inkubiert und dann tropfenweise auf die vorbereiteten Zellkulturschalen pipettiert. Nach einer Inkubation von 3,5 Std. bei 37°C im Zell-Inkubator wurde das HEK-Transfektionsmedium mit der Transfektionslösung durch HEK-Kulturmedium ersetzt.

3.6. Transformation

50 ng Plasmid-DNS wurden mit 50 µl der auf Eis aufgetauten chemokompetenten Bakterien gemischt und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 50 Sek. bei 42°C im Wasserbad inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Nach 2 Min. auf Eis wurden die Bakterien in 900 µl LB-Medium aufgenommen und bei 37°C für 1 Std. geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf 37°C vorgewärmte Agarplatten ausplattiert, die ein Antibiotikum, entsprechend der auf dem Vektor codierten Resistenz, enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.7. Restriktionsverdau von DNS

Ein Reaktionsansatz zur enzymatischen Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen enthielt folgende Komponenten:

| | |
|-------------------------|--|
| X µg | zu verdauende DNS |
| 1/10 des Gesamtvolumens | 10x Puffer (passend zu verwendeten Restriktionsendonuklease gemäß Herstellerangaben) |
| 1/10 des Gesamtvolumens | BSA 100 µg/ ml |
| 1 U pro µg DNS | Restriktionsendonuklease |

Bei Enzymen ohne „star activity“, d.h. ohne unspezifische Aktivität wurde bei Bedarf mit einer größeren Menge Enzym „überverdaut“. Das Volumen der eingesetzten

Restriktionsendonuklease betrug dabei maximal 1/10 des Gesamtvolumens des Reaktionsansatzes. Der Ansatz wurde bei für das jeweilige Enzym geeigneter Temperatur für 1 Std. inkubiert. Der Verdau wurde auf einem Agarosegel kontrolliert.

3.8. Extraktion und Aufreinigung von DNS

3.8.1. Aufreinigung genomischer DNS aus Gewebe

Zu 1 cm Mausschwanz entsprechend ca. 200 mg Gewebe wurden 300 µl Tail-Lysepuffer zugegeben und über Nacht bei 56°C auf dem Schüttler (1400 rpm) inkubiert. Nach Abzentrifugieren für 3 Min. bei 12000 g wurde der Überstand abgenommen und eine Phenol-Chloroformextraktion durchgeführt. Hierzu wurde jeweils einmal mit 300 µl Phenol, 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 µl Isoamylalkohol extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol. eiskaltem 100% Ethanol gefällt und das DNS-Pellet nach Abzentrifugieren (5 Min. 12000 g) einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren (3 Min., 12000 g) wurde das DNS-Pellet getrocknet und in 300 µl H₂O gelöst.

3.8.2. Minipräparation

Nach der Transformation von Bakterien (Kapitel 3.6) wurden unter sterilen Bedingungen Bakterien-Einzelkolonien in 3 ml LB-Medium überführt. Das Medium enthielt dabei ein Antibiotikum entsprechend der auf dem transformierten Vektor codierten Resistenz. Nach Schütteln über Nacht bei 37°C wurden die Kulturen durch Zentrifugation bei 3200 g für 5 Min. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet in 200 µl P1 resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 200 µl P2 lysiert. Nach Zugabe von 200 µl P3 zur Neutralisation wurde der Ansatz für 5 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 16000 g für 10 Min. bei RT wurde der Überstand einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (Kapitel 3.8). Die DNS wurde mit 500 µl Isopropanol für 10 Min. bei -20°C präzipitiert und anschließend für 10 Min. bei 16000 g und RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, 5 Min. bei 16000 g und RT erneut abzentrifugiert, getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst.

3.8.3. Maxipräparation

Nach Transformation (Kapitel 3.6) wurden Bakterien-Einzelkolonien unter sterilen Bedingungen in 3 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) überführt. Nach Inkubation bei 37°C für 3 Std. auf dem Schüttler wurde 1 ml der Kultur in 300 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler wurde die Maxipräparation mit einem „Nucleobond PC-500 Plasmid Maxi Kit“ entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.9. Polymerasekettenreaktion

Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden unter Verwendung der Taq Polymerase („non-proofreading“) in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

| | |
|----------|--------------------------|
| 100 ng | „template“-DNS |
| 2,5 µl | „sense“-Primer 10 mM |
| 2,5 µl | „antisense“-Primer 10 mM |
| 5,0 µl | 10x Taq-Reaktionspuffer |
| 2,0 µl | MgCl ₂ 25 mM |
| 0,5 µl | dNTPs 25 mM |
| 0,3 µl | Taq-Polymerase 5 U/ µl |
| ad 50 µl | H ₂ O |

Die Reaktionen wurden auf Eis angesetzt, mit Mineralöl beschichtet und unter Verwendung des folgenden Programms in einem Thermocycler inkubiert:

| | | |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 94°C | 1 Min. |
| 2. Denaturierung | 94°C | 45 Sek. |
| 3. „Annealing“ | T _m - 5°C | 45 Sek. |
| 4. Synthese | 72°C | 1 Min./ kb Länge der „template“-DNS |
| 5. Abschluss-Synthese | 72°C | 10 Min. |
| 6. Kühlung | 4°C | |

Die Schritte 2 bis 4 wurden dabei 30 Mal wiederholt. Die T_m, d.h. die Schmelztemperatur der verwendeten Primer, wurde den Berechnungen der Herstellerfirma entnommen.

3.10. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

Zur gelelektrophoretischen Trennung von DNS wurden, abhängig von der erwarteten Fragmentlänge 1-prozentige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wurde hierzu in 1x TAE-Puffer durch Kochen vollständig gelöst, die Lösung abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt und in eine Horizontalkammer gegossen. Nach Aushärtung wurde das Gel in eine mit 1x TAE gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 0,1 Vol. 10x DNS-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (Spannung 5V/ cm Elektrodenabstand) wurden die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und konnten aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation wurde mit Hilfe eines Polaroidsystems (Bio Doc Analyze, Whatman) durchgeführt.

3.11. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Zu gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung eines „Mini-Protean III-Systems“ (BioRad) genutzt. Das Trenngel wurde hierbei luftblasenfrei zwischen zwei Glasscheiben in 1 mm Abstand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. In Abhängigkeit der aufzutrennenden Proteine wurden 6- und 10-prozentige Gele folgender Zusammensetzung verwendet:

Tabelle 5: Zusammensetzung der Trenngele bei der Gelelektrophorese von Proteinen

| <i>6prozentiges Trenngel</i> | <i>10prozentiges Trenngel</i> | <i>Komponenten</i> |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| 1,08 ml | 0,9 ml | H ₂ O |
| 1,02 ml | 1,7 ml | 30% Acryl-Bisacrylamid |
| 2,5 ml | 2,5 ml | Trenngelpuffer |
| 0,04 ml | 0,04 ml | APS 12,5 % |
| 0,004 ml | 0,004 ml | TEMED |

Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit einem Sammelgel folgender Zusammensetzung überschichtet:

Tabelle 6: Zusammensetzung der Sammelgele bei der Gelelektrophorese von Proteinen

| <i>Sammelgel</i> | <i>Komponenten</i> |
|------------------|------------------------|
| 0,75 ml | H ₂ O |
| 0,5 ml | 30% Acryl-Bisacrylamid |
| 1,25 ml | Sammelgelpuffer |
| 0,03 ml | APS 10% |
| 0,003 ml | TEMED |

In das Sammelgel wurde ein Gelkamm eingeführt. Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und in die entstandenen Taschen 25 µl der mit 4x Laemmli-Puffer versetzten Probe eingefüllt. Ein Molekulargewichtsstandard wurde standardmäßig mitgeführt, um eine spätere Zuordnung der detektierten Proteine zu einem Molekulargewicht zu erlauben. Der Gellauf wurde bei 150 V im Laufpuffer durchgeführt. Die Gele wurden anschließend für Coomassie-, Silberfärbungen (Kapitel 3.12.2-3) oder den Western Blot (Kapitel 3.17) verwendet.

3.12. Konzentrations- und Aktivitätsbestimmungen von Proteinen

3.12.1. Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmung über Alkaline-Phosphatase-Aktivität

Zur Bestimmung der AP-Aktivität des Sema4D-AP-Konstrukts wurden 250 µl des Überstandes von mit dem Konstrukt transfizierten HEK-Zellen abgenommen und für 5 Min. auf 65°C im Wasserbad erwärmt, um endogene Phosphatasen zu inaktivieren. Anschließend wurde das Medium 2 Min. bei 14000 g zentrifugiert. Es wurden 10 µl Medium mit 90 µl H₂O und 100 µl 2x SEAP-Puffer versetzt und für 10 Min. in einer 96-Well-Platte auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden 20 µl vorgewärmter pNPP-Puffer zugegeben und vermenget. Es folgte die Messung der Absorbtion bei 405 nm (A_{405}) in einem Spektrometer (Ascent, Thermo Electron Corporation) bei RT in 1 Min.-Intervallen. Die ermittelte Absorbtion wurde gegen die Zeit geblottet und die maximale lineare Reaktionsrate ermittelt. 1 mU ist als die Menge an AP definiert, die 1 pmol para-Nitrophenylphosphat pro Min. umsetzt. Dies entspricht einem Anstieg der Absorbtion von 0,04 A_{405} pro Min.. Die Konzentration an Sema4D-AP wurde über die Spezifische Aktivität der SEAP von 2000 mU/ µg Protein und dem Molekulargewicht von SEAP bestimmt 162, 163.

3.12.2. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine (Kapitel 3.11) wurde das Gel mit 200 ml Proteingel-Färbelösung versetzt und für 1 Std. bei RT auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit H₂O gewaschen und es wurden 200 ml Proteingel-Entfärbelösung zugegeben und für 45 Min. auf dem Taumler bei RT inkubiert. Die Proteingel-Entfärbelösung wurde ausgetauscht und das Gel wurde über Nacht bei RT auf dem Taumler weiter entfärbt. Anschließend wurden die Gele mit Tos-Puffer in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Bandenvergleich mit BSA-Vergleichsbanden von 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 7 und 10 µg.

3.12.3. Silberfärbung von Proteingelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine (Kapitel 3.11) wurde die Silberfärbung unter Zuhilfenahme des „Serva Silverstain Kits“ (Kapitel 3.12.3) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Gele mit TBS-Puffer in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.12.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde in 96-Loch-Platten durchgeführt. Zunächst wurde aus einer BSA-Stammlösung (100µg/ ml) eine Verdünnungsreihe hergestellt (0, 20, 30, 40, 50, 80, 100 µg/ ml). Die zu messenden Proben wurden ebenfalls verdünnt (1:25, 1:50, 1:100, 1:200). 50µl der jeweiligen Verdünnungen wurden mit 200 µl Roti-Quant (2,56:10 in H₂O verdünnt) versetzt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Danach wurde die Absorbtion der Proben bei 595 nm (A_{595}) in einem Spektrometer (Ascent, Thermo Electron Corporation) gemessen und basierend auf der BSA-Standardkurve mit der Hersteller-Software die Proteinkonzentration errechnet.

3.12.5. Bestimmung der Proteinfunktionalität über RhoA-Aktivierung

Die Bestimmung von aktiviertem RhoA erfolgte über eine Präzipitation mittels einer RBD-Bindungsdomäne, die nur GTP-gebundenes, d.h. aktiviertes RhoA, bindet. Hierzu wurden zunächst HEK-Zellen mit VSV-getaggen Plexin-B1, FLAG-getaggen PDZ-RhoGEF und

Myc-getaggten RhoA mit der Calciumphosphat-Methode (Kapitel 3.5) transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen für 12 Std. „gestarved“ und anschließend mit konzentriertem (Kapitel 3.13) oder purifiziertem (Kapitel 3.14) Sema4D- oder Kontrollmedium versetzt. Die Menge an aktiviertem zellulären RhoA wurde über die Präzipitation mit einem Fusionsprotein, bestehend aus GST und der Rho-Bindungsdomäne von Rhotekin (GST-RBD) vollzogen. Hierzu wurden zunächst die Zellen lysiert (Kapitel 3.15) und dann in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem Fusionsprotein versetzt und 50 Min. bei 4°C rotiert. Es folgten 4 Waschschrte der „Beads“ in RIPA-Puffer. Anschließend wurden der „Bead“-Pellet in 25 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und für 5 Min. auf 99°C erhitzt. Die Menge an präzipitiertem RhoA wurde über einen Western Blot ermittelt (Kapitel 3.17) ermittelt. Die Bestimmung der RhoA-Aktivierung wurde in Kooperation mit Jakob Swiercz, Universität Heidelberg, durchgeführt.

3.13. Aufkonzentrierung von Proteinen aus Zellüberständen

Die Aufkonzentrierung der Proteinen aus Überständen transfizierter HEK-Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme von Konzentratoren (Centricon Plus-20, Millipore) die selektiv Proteine mit einer Größe über 100 kDa zurückhalten. Vor der Verwendung wurden die Konzentratoren zunächst mit 70 % EtOH befüllt und bei 4000 g für 10 Min. zentrifugiert. Anschließend wurden sie mit PBS versetzt und erneut bei 4000 g für 10 Min. zentrifugiert. 48 Std. nach der Transfektion wurden die Überstände von den HEK-Zellen abgenommen, für 5 Min. bei 2000 g und 4°C zentrifugiert und in die Konzentratoren gegeben. Es folgte eine Zentrifugation von 25 Min. bei 4000 g und 4°C. Die Konzentratoren wurden anschließend invertiert und das Konzentrat wurde aus ihnen über eine Zentrifugation von 1 Min. bei 1000 g und 4°C gewonnen. Anschließend wurde die Aktivität des Konzentrats über die alkaline Phosphataseaktivität der exprimierten Proteine bestimmt (Kapitel 3.12.1) und die Proteinlösungen wurden auf eine Aktivität von 3000 mU/ml standardisiert. In den jeweiligen Experimenten wurde diese Stammlösung auf eine Aktivität von 150 mU/ml verdünnt. Dies entsprach annäherungsweise einer Konzentration von 1 nM.

3.14. Proteinpurifizierung

Zu Proteinpurifizierung wurden Proteine aus Zellüberständen mittels Affinitätschromatographie zunächst getrennt, dann unter Zuhilfenahme von Zentrifugationsfiltern aufkonzentriert und über eine Gelfiltrationschromatographie gereinigt.

Im ersten Schritt, der Affinitätschromatographie, wurde das Zellkulturmedium abgenommen und 10 Min. bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, filtriert (0,22 µm) und das Filtrat 1:3 mit PBS verdünnt und 1 M Tris-HCl pH 8,0 auf 10 mM eingestellt. Es wurde Ni-NTA Agarose zugegeben (2,5 ml/ 1 Medium) und für 2 Std. bei 4°C rotiert. Im Anschluss wurde die Suspension auf die Säule (Econo-Column Chromatography Column, BioRad) gegeben und die Säule mit dem 20fachen Volumen an 10 mM Tris/ pH 8,0 gewaschen. Die Elution erfolgte unter Zugabe des 5-10fachen Volumens an Elutionslösung. Das Eluat wurde auf einen Zentrifugationsfilter (Amicon Ultra-15, Millipore) gegeben und bei 4000 g und 4°C auf ca. 250 µl eingengt. Es folgte nun die Gelfiltrationschromatographie auf einem Säulenchromatographen. Zunächst wurde die Säule (Superdex 200 10/300 GL, Amersham) mit H₂O gewaschen und im Anschluss mit Laufpuffer (PBS pH 7,4) äquilibriert. Zur Proteinaufreinigung wurde dann das Eluat auf die Säule appliziert und die verschiedenen Fraktionen mit dem Fraktionskollektor aufgenommen.

3.15. Proteinextraktion aus HEK-Zellen

Nach Entfernung des HEK-Kulturmediums und einmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und die Zellen in 900 µl 1x RIPA-Puffer lysiert. Bei transfizierten HEK-Zellen wurde die Lyse 48 Std. nach der Transfektion durchgeführt. Das Lysat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 30 Min. bei 4°C rotiert. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C 10 Min. bei 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und sofern keine Präzipitation folgte mit einem geeigneten Volumen 4x Laemmli-Puffer versetzt und bei 99°C für 5 Min. denaturiert.

3.16. Proteinextraktion aus Neuronen

Das Kulturmedium wurde entfernt und die Neuronen wurden direkt mit auf 99°C erhitztem 1x Laemmli-Puffer beschichtet und unter Zuhilfenahme eines Zellschabers in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

3.17. Western Blot

Proteine wurden vom SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 3.11) auf Nitrozellulosemembranen unter Verwendung eines „Mini-Transblot“-Apparates (BioRad) transferiert. Der Aufbau des „blotting sandwich“ entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer durch Anlegen eines konstanten Stroms von 350 mA für 1,5 Std.. Nach dem Transfer wurden die Membranen in Ponceaus S gefärbt, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen. Durch kurzes Waschen in 1x TBS wurde die Membran anschließend wieder entfärbt. Durch Inkubation der Membran in 5 % Magermilch (5% in 1x TBST, w/v) für 1 Std. bei RT wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Danach wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (in 5% Magermilch in 1x TBST) bei 4°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Membran 3x für 15 Min. in 1x TBST gewaschen. Die Inkubation mit einem Spezies-spezifischen Sekundärantikörper (Anti-IgG gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) in der geeigneten Verdünnung (in 5% Magermilch in 1x TBST) wurde bei RT für 2 Std. durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in 1x TBST für jeweils 15 Min. wurden die immunoreaktiven Banden durch Chemolumineszenz unter Zuhilfenahme eines Kits (Immoblion Western, HRP-Substrate) und geeigneten Filmmaterials (Kodak X-Omat AR) visualisiert.

3.18. Immunhistochemische Färbungen

Es wurden Kryotomschnitte von Embryos mit einer Schnittdicke zwischen 20-25µm angefertigt und diese auf Poly-L-Lysin beschichtete Glassobjektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden 30 Min. luftgetrocknet und in 4% Paraformaldehyd für 20 Min. fixiert. Nach Behandlung mit 1% H₂O₂ in 1x PBS/ Methanol (1:1) wurden die Schnitte 3x für je 10 Min. in 1x PBS gewaschen und danach für 30 Min. in „normal goat serum“ (NGS, 5% in PBST) geblockt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Antikörper (in geeigneter Verdünnung in 5% NGS in 1x PBST) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS für je 10 Min. wurden die Schnitte bei RT mit dem entsprechenden biotinylierten Zweitantikörper (aus Vectastain ABC Elite Kit) in geeigneter Verdünnung für 30 Min. inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS für je 10 Min. wurde die immunologische Detektion mittels Vectastain ABC Elite Kit und AEC-Substrat entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Färbungen wurden in Kooperation mit Suhua Deng, Universität Heidelberg, angefertigt.

3.19. Immunzytochemische Färbungen

Die bereits auf „Coverslips“ fixierten Zellen wurden 2x 5 Min. mit 50 mM Glycin in PBS bei 4°C behandelt. Es folgte ein Waschschriff von 5 Min. mit PBS und ein 10-minütige Behandlung mit 0,2% Triton-X in PBS bei 4°C. Es wurde dann 30 Min. bei RT mit „normal goat serum“ (NGS, 4% in PBST) blockiert und im Anschluss über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Antikörper (in geeigneter Verdünnung in 2% NGS in PBST) inkubiert. Nach 4-maligem 10-minütigem Waschen mit einer Lösung aus PBS und 1%igem NGS erfolgte eine Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper in PBS mit 1,5% NGS von einer Std.. Danach wurden die Zellen für 10 Min. mit einer DAPI-Lösung inkubiert (Verdünnung 1:20000, in PBS mit 1% NGS). Es folgten ein 10-minütiger Waschschriff mit PBS mit 1% NGS und zwei 10-minütige Waschschriffe mit PBS. Nach eine 10-minütigen Behandlung mit Tris-HCl pH 8,0 wurden die Zellen mit Mowiol auf Objektträger eingebettet.

Tabelle 6: Verdünnungen der für Immunhisto- und Immunzytochemie verwendeten Antikörper

| <i>Antikörper</i> | <i>Verdünnung</i> | <i>Antikörper</i> | <i>Verdünnung</i> |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|
| anti-Calbindin | 1:2000 | anti-NeuN | 1:2000 |
| anti-Calretinin | 1:600 | anti-mTOR | 1:1000 |
| anti-FLAG | 1:5000 | anti-phospho-mTOR (Ser2448) | 1:1000 |
| anti-GFAP | 1:500 | | |
| anti-GFP | 1:1000 | anti-c-Myc | 1:1000 |
| anti-GSK-3beta | 1:1000 | anti-Synaptophysin | 1:200 |
| anti-GSK-3beta [pS ⁹] | 1:1000 | anti-Tau-1 | 1:500 |
| anti-His(6) | 1:1000 | anti-Tubulin | 1:1000 |
| anti-MAP2 | 1:500 | anti-VSV | 1:200 |

3.20. Bindungsstudie an hippocampalen Neuronen

Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Neuronen wurden mit HBHA-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation von 2 Std. mit Sema4D-AP (aus Sema4D-Medium) bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellen 6x für 3 Min. mit HBHA gewaschen und dann für 15 Min. mit PFA fixiert und erneut 2x mit HBHA-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation von 30 Min. bei 65°C im Wasserbad, um endogene Phosphatasen zu inaktivieren. Über Nacht wurden die Neurone mit AP-Färbepuffer bei RT inkubiert.

3.21. DiI-Färbung hippocampaler Schnitte mit einer Genkanone

Die Methode eignet sich für die Färbung von fixierten und unfixierten organotypischen hippocampalen Schnitten (Kapitel 3.2.4.). Sie basiert auf dem Transfer von möglichst kleinen DiI-Partikeln in einzelne Zellen, um diese selektiv in einem Verbund von Zellen anzufärben. Der Transfer erfolgt unter Zuhilfenahme einer Genkanone (PDS 1000, Biorad), die DiI überzogene Goldpartikel über eine Heliumdruckwelle beschleunigt und in das Gewebe befördert.

Es wurden zunächst die Goldpartikel (Microcarrier) mit einer DiI-Lösung (1,5 mg DiI in 100 µl Methylen-chlorid) überzogen. Hierzu wurden 15 mg Goldpartikel auf einem Objektträger verteilt und mit der DiI-Lösung bedeckt. Nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, wurden die überzogenen Goldpartikel mit einem Skalpell von dem Objektträger entfernt, in 10 ml H₂O aufgenommen und 2 Min. in ein Ultraschallbad gegeben. Im Anschluss wurden die Partikel weitere 2 Min. mit einem Vortexer separiert. Es wurden 200 µl der Suspension auf jeweils einen Macrocarrier gegeben und bei 60°C das Wasser verdampft. Der Transfer der mit DiI überzogenen Goldpartikel wurde mit einer Genkanone durchgeführt (PDS 1000, BioRad). Als Parameter wurden ein Druck von 1100 psi, ein Abstand zwischen Makrocarrier und Gewebe von 9 cm und ein Kammervakuum von 25 mmHg eingestellt. Die organotypischen Schnitte befanden sich auf Zellmembranen (Kapitel 3.2.4.) in 3 cm Zellkulturschalen, zwischen den Schnitten und dem Macrocarrier wurde zusätzlich ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 70 µm (Cell Strainer, BD Falcon) positioniert, um Schaden durch den Heliumeinstrom zu minimieren. Nach dem Transfer wurden die Schnitte für 2 Std. in einen Zellkulturinkubator (5% CO₂, 37°C) gegeben und dann für 3 Std. in 4% PFA fixiert. Vor dem Einbetten mit Mowiol auf Objektträgern wurden die Schnitte für 1 Std. mit einer DAPI-Lösung (1:20000 Verdünnung, in PBS) beschichtet und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Die Analyse der gefärbten Neurone erfolgte nach der Sholl-Methode (Kapitel 3.25.3).

3.22. *In-situ*-Hybridisierung

Es wurden 20 µm Schnitte gefrorener Embryos am Kryostat angefertigt, auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger gegeben, 30 Min. getrocknet und in 4% PFA für 20 Min. fixiert. Nach dem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte für 90 Sek. mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert, erneut mit PBS gewaschen und für 10 Min. mit 4% PFA behandelt. Anschließend wurden die Schnitte nochmals gewaschen und für 5 Min. in TAE äquilibriert,

bevor sie mit 0,25% Essigsäureanhydrid in 1x TEA für 10 Min. inkubiert wurden. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit cRNS-Sonden versetzt (Verdünnungen je nach Konzentration in Hybridisierungspuffer) und über Nacht bei 65°C in einer feuchten Kammer mit 5x SCC/ 50% Formamid inkubiert. Nach dem Waschen mit 2x SSC wurden die Schnitte mit RNaseA behandelt (50µg/ ml für 30 Min. bei 37°C) und im Anschluss daran bei 50°C für 7 Min. in 0,2x SCC und bei RT für 5 Min. in 0,2x SSC gewaschen. Nachdem die Schnitte in Maleinsäurepuffer äquilibriert und in Blockierungspuffer für 1 Std. geblockt worden waren, wurden sie für 1 Std. mit anti-DIG-AP-Fab-Fragmenten (1:1500 in Blockierungspuffer) behandelt. Nach Waschen mit Maleinsäurepuffer und Äquilibrieren in Detektionspuffer wurden die Schnitte für 36 Std. mit NBT/ BCIP in Detektionspuffer inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit TE gestoppt und die Schnitte in Mowiol eingebettet. Die Durchführung der *in-situ*-Hybridisierung erfolgte in Kooperation mit Thomas Worzfeld.

3.23. Lac-Z Färbung

Es wurden wie unter Kapitel 3.22 beschrieben Kryotomschnitte angefertigt und fixiert. Es folgte dreimaliges Waschen in β -Galaktosidase-Waschlösung für 5 Min. bei 4°C. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C in β -Galaktosidase-Färbelösung inkubiert. Danach wurde mehrmals in Basispuffer gewaschen, bis die gelbe Farbe der β -Galaktosidase-Färbelösung nicht mehr erkennbar war. Anschließend wurden die Schnitte in Mowiol eingebettet.

3.24. Video-Mikroskopie

Für die Aufnahme von Neuronen in Zeitintervallen wurde ein „Live-cell imaging system“ (Leica Microsystems) verwendet. Die hippocampalen Neurone wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben entnommen und Poly-L-Lysin-überzogene 4-Lochplatten (Nunclon Surface, Nunc) ausplattiert. Sie wurden dann 2 Tage bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert, mit Sema4D oder PBS als Kontrolle versetzt und in das „Live-cell imaging system“ überführt. Dort wurden über einen Zeitraum von 4 Std. bei 5% Carbogen und 37°C von ausgewählten Neuronen im Abstand von 4 Min. Bilder aufgenommen.

3.25. Analyse und Quantifizierung der Morphologie von hippocampalen Neuronen

3.25.1. Analyse von Axonen und Dendriten dissoziierter Neurone

Die Färbung von Dendriten und Axonen erfolgte DIV 3 immunzytochemisch (Kapitel 3.18) gegen die Markerproteine MAP2 und Tau, die in Dendriten, bzw. Axonen spezifisch exprimiert werden. Die Neurone wurden mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS AOBS) gescannt. Die Verzweigungen und Längen der Fortsätze einzelner Neurone wurden dann unter Zuhilfenahme des NeuronJ Pulgins der NIH Software ImageJ 1.37v analysiert. Hierfür wurden die Maximalprojektionen der mit dem Konfokalmikroskop aufgenommenen Bilderreihen verwendet.

3.25.2. Quantifizierung von Synapsen dissoziierter Neurone

Die Untersuchung der Synapsendichte wurde DIV 21 an dissoziierten hippocampalen Neuronen von Wildtyp- und Plexin-B1-Knockout-Mäusen durchgeführt. Die Färbung der Dendriten und Synapsen erfolgte immunzytochemisch (Kapitel 3.18) gegen die Markerproteine MAP2 und Synaptophysin. Zur Analyse wurden pro Neuron 2 nahe am Soma gelegene Dendriten verwendet. Dies wurden mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS AOBS) gescannt und es wurden Bilderreihen erstellt. Alle Synaptophysin-positiven Synapsen innerhalb eines 30 µm Bereichs eines Dendriten wurden unter Zuhilfenahme der ImageJ Software 1.37v ausgezählt.

3.25.3. Rekonstruktion und Analyse der Verzweigungen von Neuronen aus hippocampalen Schnitten

Die Untersuchung der Morphologie komplexer Neuronen in organotypischen hippocampalen Schnitten (Kapitel 3.2.4) erfolgte nach einer Genkanonen-vermittelten DiI-Färbung einzelner Neurone. Zur Analyse wurden pyramidale hippocampale Neurone der CA1-Region ausgewählt und mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS AOBS) gescannt. Die Morphologie der Neurone wurde aus den entstandenen Bilderreihen mit dem Neuron Morphology Pulgin der NIH Software ImageJ 1.37v und der CVAPP Software (<http://www.compneuro.org>) rekonstruiert. Die Struktur der Neurone wurde mit einer Sholl-Analyse (164) unter Zuhilfenahme des Sholl Analysis Pulgins der NIH Software ImageJ

1.37v analysiert. Bei einer Sholl Analyse werden zellspezifische Verzweigungsmuster quantifiziert. Hierfür werden Kreise verschiedener Radien im Abstand von jeweils 15 μm um das Zellsoma konstruiert und die Schnittpunkte der Dendriten mit den Kreisradien ausgezählt.

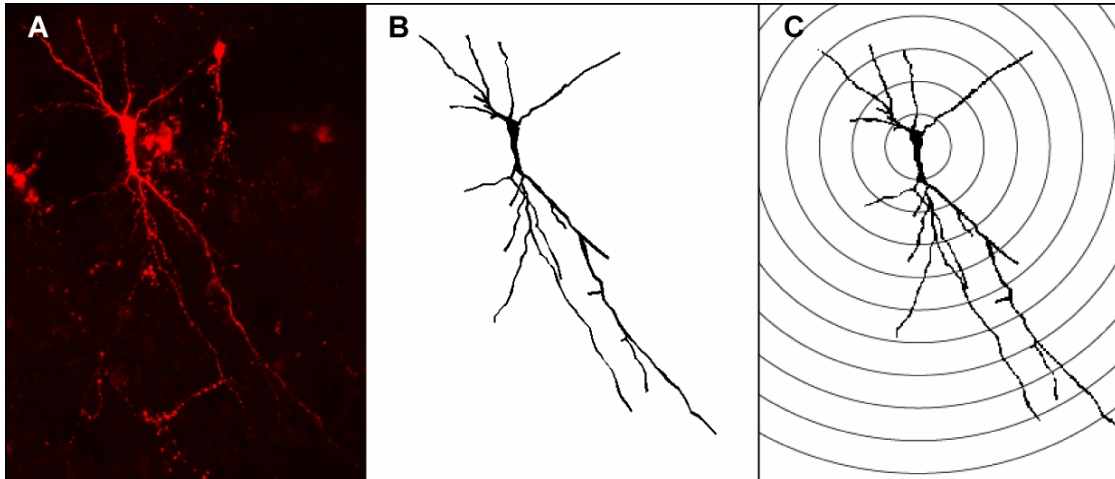


Abbildung 7: Rekonstruktion DiI-gefärbter hippocampaler Neurone. Die Neurone wurden mittels Genkanone (Kapitel 3.21) mit DiI gefärbt (A), unter Verwendung des Neuron Morphology Pulgins der NIH Software ImageJ 1.37v und der CVAPP Software (<http://www.compneuro.org>) rekonstruiert (B) und unter Zuhilfenahme des Sholl Analysis Pulgins der NIH Software ImageJ 1.37v einer Sholl-Analyse unterzogen (C).

3.25.4. Datenanalyse und Statistik

Sämtliche Daten repräsentieren den mittleren Standardfehler S.E.M („standard error of the mean“). Die Daten wurden statistisch über eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Fischer’s post-hoc Test oder mit einem gepaarten Student-t-Test ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Expressionsanalyse von Sema4D und Plexin-B1 im Hippocampus

Die mRNA von Plexin-B1 wurde im Folgenden mit plexin-B1, von Sema4D mit Sema4d bezeichnet. Über eine *in-situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten Plexin-B1- und Sema4D-Riboproben erfolgte die Expressionsanalyse von Sema4d und plexin-B1 mRNA im Hippocampus in einer C57BL/6 Mauslinie.

Sema4d und Plexin-b1 mRNA werden zwischen E13.5 und P10 im sich entwickelnden Hippocampus exprimiert. Postnatal nimmt die Expression danach schrittweise bis zum postnatalen Tag 10 ab (94, Supplement Tabelle).

In dieser Studie wurde zwischen E17 und P0 eine starke Expression beider mRNA im Hippocampus detektiert (Abbildung 8). Im Stadium E17 konnte die Sema4d und plexin-B1 mRNA bei pyramidalen Neuroblasten, die vom Kortex in die hippocampale Anlage migrieren, festgestellt werden (Abbildung 8A, Pfeilkopf). Plexin-B1 wurde am stärksten im Neuroepithel (Abbildung 8A, NE) des angrenzenden lateralen Ventrikels, Sema4d hingegen im Gyrus dentatus (Abbildung 8A, DG) exprimiert. Im Stadium P0 waren Sema4d und plexin-b1 in übereinstimmenden Mustern exprimiert, sowohl in den migrierenden pyramidalen Neuroblasten, als auch in den Zellen des Gyrus dentatus (Abbildung 8B, Pfeilkopf, bzw. DG). Im adulten Gehirn konnte keine Expression von Sema4d und plexin-B1 mittels *in-situ*-Hybridisierung mehr nachgewiesen werden (Abbildung 8C).

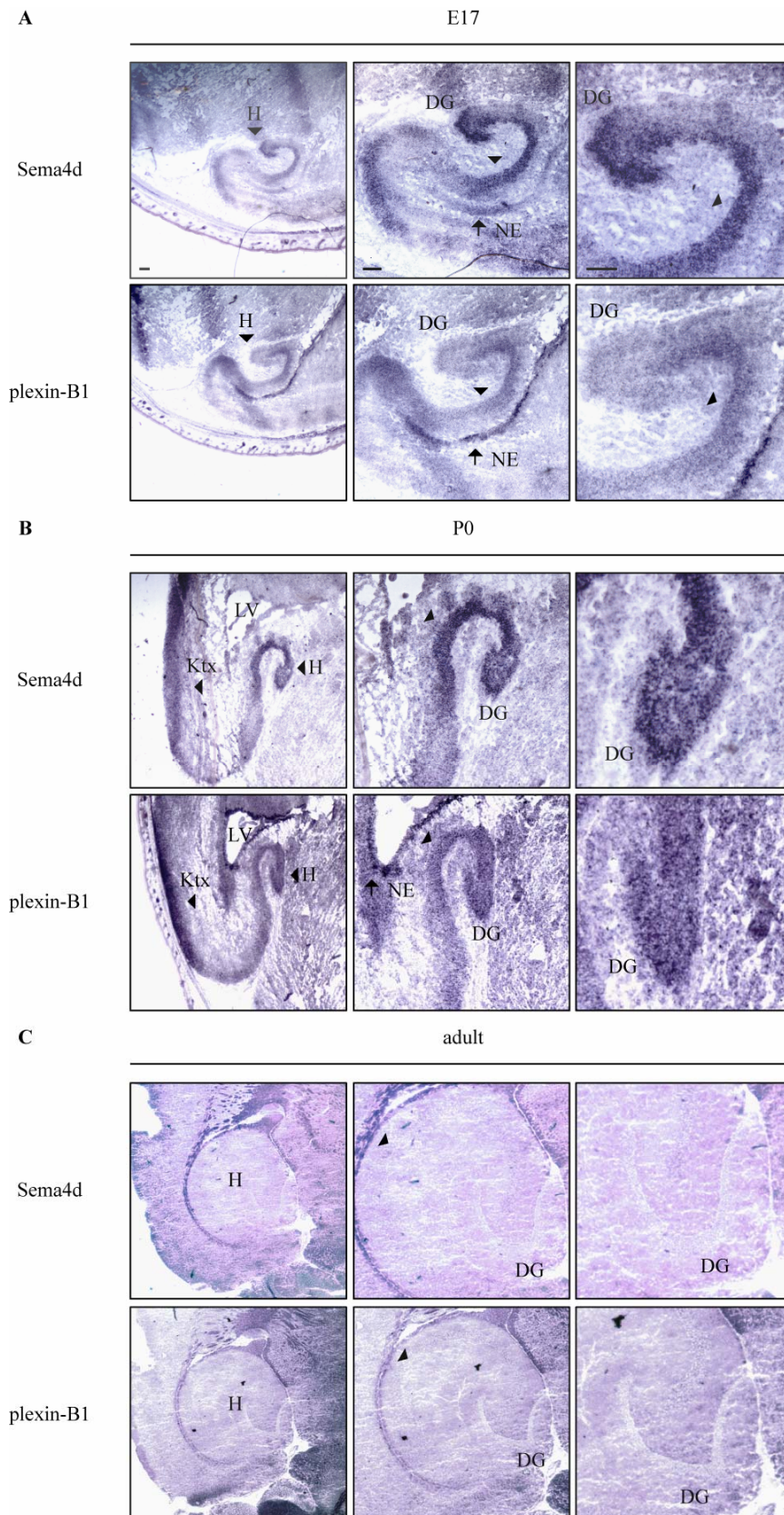


Abbildung 8: Expression von plexin-B1 und Sema4d mRNA im sich entwickelnden Hippocampus. A und B, plexin-B1 wurde von neuronalen Vorläuferzellen exprimiert, die aus dem Kortex (Ktx) in den Hippocampus (H) migrieren, in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus (Pfeilköpfe), im Gyrus dentatus und im hippocampalen Neuroepithel. Sema4d konnte in hohem Maße im Gyrus dentatus und in der

Pyramidenzellenschicht (Pfeilkopf) des Hippocampus nachgewiesen werden. C, im adulten Hippocampus wurde keine Expression mittels *in-situ*-Hybridisierung festgestellt. LV = lateraler Ventrikel, Maßstabsbalken = 200 μ m.

4.2. Herstellung und Validierung von rekombinantem Sema4D

Zur Untersuchung des Einflusses von Sema4D auf hippocampale Neurone wurden die Neurone mit Sema4D behandelt. Zur Anwendung kamen 2 verschiedene Präparationen von rekombinant hergestelltem Sema4D. Bei der einen Präparation handelte es sich um den aufkonzentrierten und standardisierten Überstand von mit einem Sema4D-Konstrukt transfizierten HEK-Zellen (Kapitel 3.13). Diese Präparation wurde im Folgenden mit Sema4D-Medium bezeichnet. Bei der zweiten Präparation handelte es sich um den mittels Gelfiltrationschromatographie (Kapitel 3.14) aufgereinigten Überstand einer stabilen, Sema4D-exprimierenden CHO-Zelllinie. Diese im hohen Maße purifizierte Präparation wies im Coomaassie-Gel keine weiteren Banden auf (Abbildung 10B). Sie wurde im Folgenden mit Sema4D-purifiziert bezeichnet. Als Kontrolle für Sema4D-Medium diente ein auf gleiche Weise aufkonzentrierter Überstand von HEK-Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert waren (Mock-Medium). Die Kontrolle für Sema4D-purifiziert war PBS, das Solvens der aufgereinigten Sema4D-Präparation.

Um die gleichbleibende Qualität der Präparationen zu gewährleisten, wurden die Stabilität, die Fähigkeit zur Dimerisation, die Aktivität, die Konzentration und die Funktionalität der jeweiligen Präparationen überprüft.

4.2.1. Dimerisierung und Stabilität

Bei Sema4D wird die Notwendigkeit einer Dimerisierung über die Sema-Domänen zur vollständigen Wirkentfaltung beschrieben (Kapitel 1.1). Eine Dimerisierung von Sema4D kann unter nicht-reduzierenden (n.r.) Bedingungen, ohne β -Mercaptoethanol-Zugabe, im Western Blot nachgewiesen werden (89).

Dieser Nachweis erfolgte in der vorliegenden Studie über den in beiden Sema4D-Präparationen enthaltenen His-Tag. Sema4D-Medium zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine deutliche Bande oberhalb 170 kDa und eine schwächere Bande um 130 kDa (Abbildung 9A, SN, n.r.), die Banden des Dimers und des Monomers. Unter reduzierenden Bedingungen (r.) konnte nur noch die Bande des Monomers um 130 kDa detektiert werden (Abbildung 9A, SN, r.). Im Lysat wurde unter beiden Bedingungen nur das

Monomer, bzw. eine Bande bei ca. 130 kDa festgestellt. (Abbildung 9A, L, n.r. und L, r.). Das als Kontrolle verwendete Mock-Medium zeigte keinerlei Banden unter den jeweiligen Bedingungen. Folglich war das Sema4D der Sema4D-Medium Präparation in der Lage zu dimerisieren.

Auch das Sema4D aus der Sema4D-purifiziert Präparation zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen die 2 Banden des Dimers und des Monomers, eine oberhalb 170 kDa und eine um die 100 kDa (Abbildung 9C, n.r.). Unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Spaltung des Dimers und es konnte nur noch die entsprechende Bande um die 100 kDa (Abbildung 9C, r.) detektiert werden. Somit konnte auch das Sema4D der Sema4D-purifiziert Präparation dimerisieren. Das geringere Molekulargewicht dieser Sema4D-Präparation lag in dem Fehlen des AP-Tags begründet.

Beide Sema4D-Präparationen kamen über einen Zeitraum von 4 Stunden zur Anwendung. Für Sema4D-Medium wurde die Stabilität vor und nach den 4 Stunden eines Experiments anhand eines Western Blots überprüft (Abbildung 9B). Die totale Menge an Sema4D veränderte sich über diesen Zeitraum nicht, unter den reduzierenden Bedingungen waren die zwei starken Banden der Monomere und die zwei schwachen Banden der jeweiligen Dimere erkennbar.

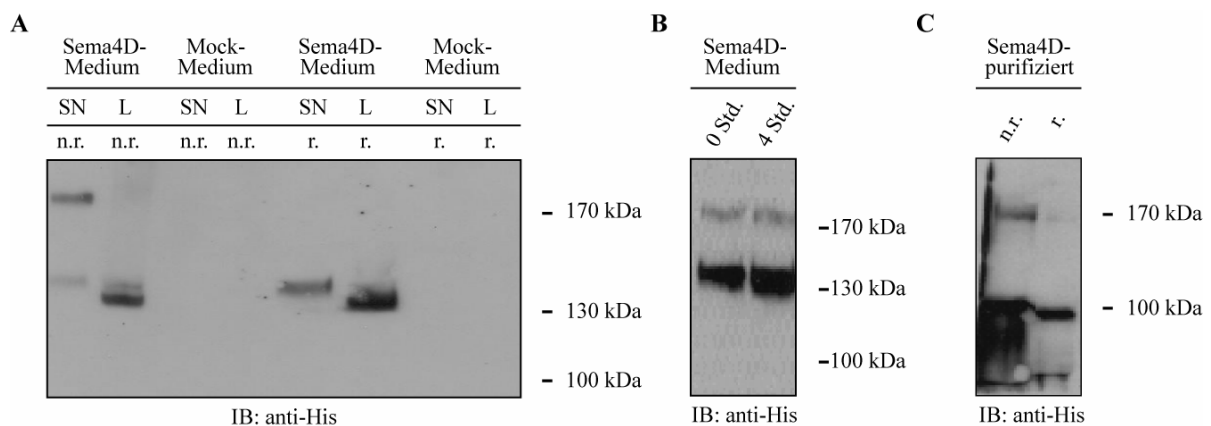


Abbildung 9: Dimerisierung und Stabilitätstest der verwendeten Sema4D-Präparationen. A, in der Sema4D-Medium Präparation war unter nicht-reduzierenden Bedingungen die kräftige Bande des Dimers oberhalb von 170 kDa erkennbar, die unter den reduzierenden Bedingungen nicht mehr nachweisbar war. In dem Maße, wie die Dimerbande abnahm, nahm das Signal der Monomerbande, bei ca. 130 kDa zu. Unter beiden Bedingungen wurde im Lysat nur das Monomer detektiert. C, die Sema4D-purifiziert Präparation zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen ebenfalls die Banden des Monomers und Dimers. Unter reduzierenden Bedingungen konnte nur noch die Bande des Monomers detektiert werden. B, innerhalb eines Zeitraumes von 4 Std. wurde kein Abfall der Menge an detektierbarem Sema4D festgestellt. Verwendete Abkürzungen: SN, Supernatant; L, Lysat; n.r., nicht-reduzierend; r., reduzierend; IB, Immunoblot.

4.2.2. Konzentrations- und Aktivitätsbestimmungen

Die Konzentrationsbestimmung der Sema4D-Medium Präparation erfolgte über eine Messung der spezifischen Aktivität der alkalischen Phosphatase „AP“, an welche das Semaphorin gebunden vorlag (Abbildung 10A, Kapitel 3.12.1). Die Präparation wurde auf eine Aktivität von 3000 mU/ml eingestellt. Für die Experimente wurden dann Verdünnungen dieser Stammlösung mit einer Aktivität von 150 mU/ml verwendet, die einer Sema4D-Konzentration von ca. 1,5 nM entsprachen. Die Konzentrationsbestimmung der Sema4D-purifiziert Präparation erfolgte nach der Bradford-Methode und mittels eines Coomassie-Gels (Abbildung 10B, Kapitel 3.12). Die Stammlösungen wurden auf eine Konzentration von 10 μ M eingestellt und für die Experimente auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt.

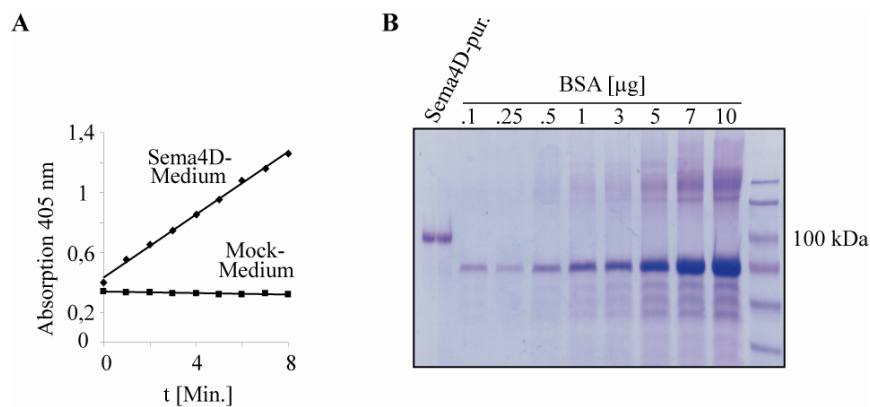


Abbildung 10: Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung der verwendeten Sema4D-Präparationen. A, die Sema4D-Konzentration der Sema4D-Medium Präparation wurde über den AP-Tag des Semaphorins durch eine Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt. Die Konzentration wurde auf 3000 mU/ml eingestellt und dann für die Experimente auf 150 mU/ml verdünnt. Dies entsprach einer Konzentration von 1,5 nM. B, die Konzentrationsbestimmung von Sema4D der Sema4D-purifiziert Präparation erfolgte über die Methode nach Bradford und ein Coomassie-Gel. Die Stammlösung wurde auf 10 μ M eingestellt und dann entsprechen der Experimente verdünnt.

4.2.3. Bindung von rekombinantem Sema4D an hippocampale Neurone

Mit diesem Experiment wurde geprüft, ob das rekombinant hergestellte Sema4D der Sema4D-Medium Präparation, dass mit einem AP-Tag versehen war, an hippocampale Neurone binden konnte. Außerdem sollte geklärt werden, wo der Sema4D-Rezeptor auf den

Neuronen exprimiert war. Als Kontrolle diente ein AP-Vektor, der nur alkaline Phosphatase exprimierte.

Eine Bindung von Sema4D-Medium an primäre hippocampale Neurone konnte sowohl an Axonen, Dendriten, als auch dem Zellsoma festgestellt werden. Die Kontrolle, Alkaline Phosphatase allein, band hingegen nicht an hippocampale Neurone (Abbildung 11).

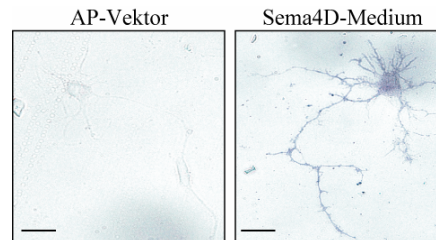


Abbildung 11: Bindung von Sema4D-Medium an hippocampale Neurone. Sema4D-Medium konnte primäre hippocampale Neurone an Axonen, Dendriten und dem Zellsoma binden. Maßstabsbalken = 40 μm .

4.2.4. Funktionalitätsbestimmung

Die Experimente zur Funktionalität sollten anhand einer Aktivierung der GTPase RhoA nachweisen, dass die jeweiligen Sema4D-Präparationen in der Lage waren einen biologischen Effekt zu vermitteln. In einem Rhotekin-basierten „Pulldown“-Experiment in mit VSV-Plexin-B1, FLAG-PDZ-RhoGEF und Myc-RhoA transfizierten HEK-Zellen führte die Inkubation mit der Sema4D-Medium und Sema4D-purifiziert Präparation zu einer erhöhten RhoA-Aktivierung (Abbildung 12). Somit waren beide Sema4D-Präparationen in der Lage in einem biologischen System einen Effekt auszuüben.

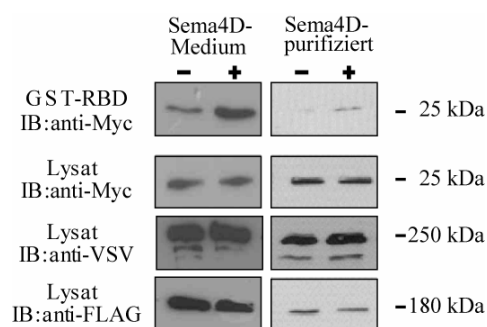


Abbildung 12: Funktionalitätsbestimmung der verwendeten Sema4D-Präparationen. Sowohl Sema4D-Medium, als auch die Sema4D-purifiziert Präparation waren in der Lage in VSV-Plexin-B1, FLAG-PDZ-RhoGEF und Myc-RhoA transfizierten HEK-Zellen RhoA zu aktivieren.

4.3. Sema4D-vermittelte Effekte auf die Morphologie sich entwickelnder dissoziierter hippocampaler Neurone

Um einen Einfluss von Sema4D auf das Wachstum embryonaler hippocampaler Neurone zu untersuchen wurden Hippocampi von E17 Embryonen entfernt, dissoziiert und neuronale Kulturen angelegt, die am DIV 2 für eine Dauer von 4 Std. mit der jeweiligen Sema4D-Präparation versetzt und anschließend immunzytochemisch gefärbt und analysiert wurden.

4.3.1. Einfluss von Sema4D auf die Entwicklung von Axonen und Dendriten

Zur Morphologieanalyse von Axonen und Dendriten erfolgte eine immunzytochemische Färbung der Markerproteine MAP2 und Tau. Bei Tau handelt es sich um ein neuronales Mikrotubuli-assoziiertes Protein, dass von Axonen exprimiert wird (165). MAP2, das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2, wird hingegen selektiv in Dendriten exprimiert (166). Nach einer 4-stündigen Behandlung mit Sema4D-Medium zeigten die Neuronen einen, im Vergleich zu Mock-Medium behandelten Neuronen, offensichtlichen Anstieg der Komplexität ihrer Neuriten (Abbildung 13A). Anhand der Immunfärbung wurden Axone und Dendriten unterschieden und getrennt analysiert.

Die Anzahl der primären Dendriten, deren Ursprung direkt am Zellsoma zu finden war, blieb unverändert ($p = 0.037$). Diese Beobachtung schloss eine Beeinflussung der Neuritogenese von Dendriten durch Sema4D aus. Der Effekt manifestierte sich vielmehr in einem Anstieg von sekundären Dendriten und Dendriten höherer Ordnung (Abbildung 13B, $p = 0.009$ im Vergleich zu Mock-Medium behandelten Neuronen). Weiterhin wurde festgestellt, dass die primären Dendriten Sema4D-behandelter Neurone eine kleine, aber unsignifikante Abnahme in ihrer durchschnittlichen Länge im Vergleich zu Mock-Medium behandelten Neuronen (Abbildung 13B) vorwiesen.

Die Anzahl der axonalen Verzweigungen erschien bei Sema4D-Medium behandelten Neuronen im Vergleich zu Mock-Medium behandelten Neuronen ebenfalls erhöht, wobei die Differenz bei der verwendeten Sema4D-Konzentration von ca. 1 nM keine Signifikanz erreichte (Abbildung 13C, $p = 0.09$). Die axonale Länge zwischen Sema4D- und Mock-Medium behandelten Neuronen blieb unverändert ($p = 0.28$).

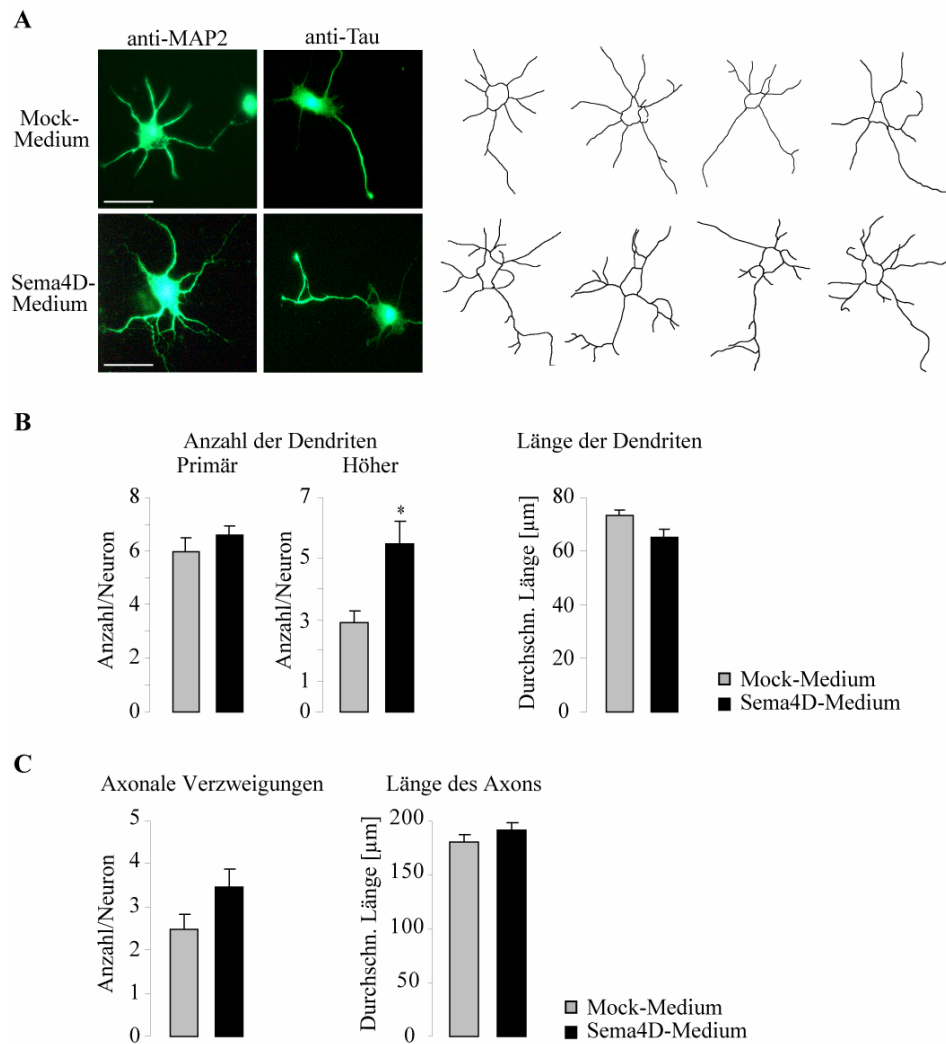


Abbildung 13: Sema4D stimulierte die Verzweigung von Neuriten in primären hippocampalen Neuronen.

A, typische Beispiele immunzytochemisch gefärbter und rekonstruierter Neurone nach der 4-stündigen Behandlung mit Sema4D-Medium oder Mock-Medium. Dendriten und Axon konnten durch die Immunfärbung gegen MAP2 und Tau, spezifische Markerproteine für Dendriten und Axone, unterschieden werden. B und C stellen die quantitative Auswertung der Sema4D-vermittelten Effekte auf Dendriten und Axone in hippocampalen Neuronen dar. Die Applikation von Sema4D führte zu einem Anstieg der höheren dendritischen Verzweigungen ($p = 0.009$, Student-t-Test), die als Dendriten zweiter und höherer Ordnung definiert wurden. Die Anzahl primärer Dendriten, bzw. Dendriten erster Ordnung wurde nicht beeinflusst, Sema4d hatte somit keinen Effekt auf die Neuritogenese. Maßstabsbalken = $40 \mu\text{m}$. Je Gruppe $n > 100$, aus 3 Experimenten.

4.3.2. Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit des Sema4D-vermittelten Effekts

Um einen möglichen Effekt von zusätzlichen, in der Sema4D-Medium Präparation enthaltenden, Substanzen auszuschließen wurden Experimente mit der aufgereinigten

Sema4D-purifiziert Präparation durchgeführt. Diese Sema4D-Präparation enthielt keine weiteren, auf einem Coomassie-Gel detektierbaren Verunreinigungen (Kapitel 4.2.2).

In Übereinstimmung mit den unter Kapitel 3.3.1 beschriebenen Effekten führte auch die 4-stündige Behandlung der Neurone mit der Sema4D-purifiziert Präparation in Konzentrationen von 1,8 nM, 18 nM und 180 nM, im Vergleich zu den mit der Kontrolle behandelten Neuronen, zu einem Anstieg der sekundären und höheren dendritischen Verzweigungen. Dieser Effekt war Dosis-abhängig und erreichte bereits bei einer Konzentration von 1,8 nM statistische Signifikanz (Abbildung 14, $p < 0.001$). In ähnlicher Weise zeigte die Behandlung mit dieser aufgereinigten Präparation einen Anstieg der axonalen Verzweigungen. Statistische Signifikanz wurde jedoch erst ab einer Konzentration von 180 nM erreicht ($p = 0.008$). Die Anzahl der primären Dendriten blieb auch bei der Applikation von Sema4D-purifiziert in sämtlichen Konzentrationen unverändert.

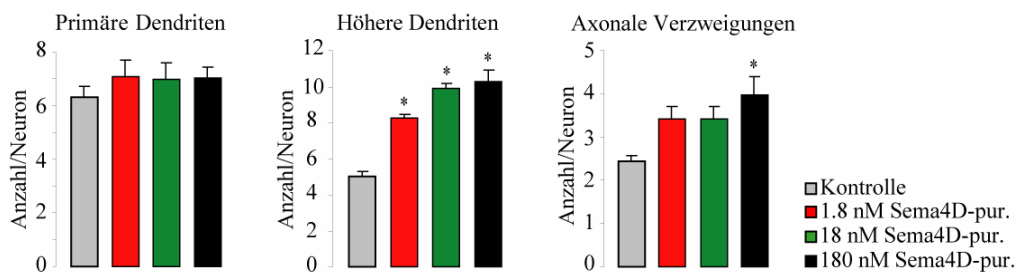


Abbildung 14: Dosisabhängigkeit des Sema4D-vermittelten Effekts. Die Applikation von purifiziertem Sema4D führte zu einem Dosis-abhängigen Anstieg der axonalen und höheren dendritischen Verzweigungen in sich entwickelnden hippocampalen Neuronen. Die Anzahl der primären Dendriten blieb unverändert. (alle * $p < 0.01$, ANOVA gefolgt von einem post-hoc Fisher Test, je Gruppe $n > 60$, aus 3 Experimenten)

4.3.3. Mechanismen der Sema4D-induzierten axonalen Verzweigung

Axone können sich auf unterschiedliche Weise verzweigen. Bei der interstitiellen axonalen Verzweigung entspringen neue kollaterale Verzweigungen direkt am Schaft des primären Axons in einem 90° Winkel. Bei der axonalen Bifurikation teilt sich an der Spitze des Axons der Wachstumskegel und wächst in unterschiedliche Richtungen weiter. Als ein dritter Mechanismus wird die Verzweigung nach dem Auftreten von komplexen pausierenden Wachstumskegeln („LPGC, large paused growth cones“) beschrieben, die über einen längeren Zeitraum mit dem Längenwachstum aussetzen (167). Während dieser Zeit zeigen die Wachstumskegel ein spezielles Verhalten, das durch sich wiederholendes Kollabieren,

Retrahieren und Elongieren gekennzeichnet ist, das ohne axonales Längenwachstum einhergeht. Dieser Zustand kann zwischen 1 Std. und 30 Std. andauern. Der Wachstumskegel gewinnt in dieser Zeit an Komplexität, er vergrößert sich und bildet vermehrt Lamellopodia aus. Aus dem vergrößerten Lamellopodium geht dann am Ende des Pausierverhaltens ein neuer Wachstumskegel hervor und das Axon gewinnt an Länge. Der Rest des vergrößerten Wachstumskegels bleibt am Axonschaft zurück. Aus dieser Struktur entspringt mit einer Verzögerung von mehreren Std. bis Tagen eine neue axonale Verzweigung (167).

Um Rückschlüsse über die Mechanismen der Sema4D-induzierten Verzweigungen zu ziehen, wurden Kulturen primärer hippocampaler Neurone mit Sema4D-purifiziert oder Kontrolle versetzt und über einen Zeitraum von 4 Std. unter Zuhilfenahme der Video-Mikroskopie (Kapitel 3.24) aufgenommen. Innerhalb dieses Zeitraumes elongierte das primäre Axon und entlang des Axonschafts entwachsen neue axonale Verzweigungen (Abbildung 15A, Pfeilköpfe, Abbildung 15B). Das Axon und die neuen Verzweigungen unterliefen wiederholten Retrahierungen und Elongationen, insgesamt gewann das Axon an Länge. In dem Zeitraum von 4 Std. konnten keine komplexen vergrößerten Wachstumskegel festgestellt werden, ein Tatsache, die in der geringen Anzahl an Neuronen, die mit der Video-Mikroskopie erfasst wurden, begründet sein könnte. Um eine größere Anzahl an Neuronen zu untersuchen wurden im folgenden Experiment die Neurone nach einer 4-stündigen Behandlung mit der Sema4D-Medium Präparation oder ihrer entsprechenden Kontrolle immunzytochemisch gegen tyrosiniertes Tubulin gefärbt. Die Behandlung mit der Sema4D-Präparation führte zu einem Anstieg der Anzahl komplexer pausierender Wachstumskegel (Abbildung 15D, $p < 0.05$). In der Mehrheit der Fälle war bei den komplexen pausierenden Wachstumskegeln (Abbildung 15C, Pfeil) eine neue axonale Verzweigung erkennbar (Abbildung 15C, Pfeilkopf).

In keinem der beiden Experimente konnte eine Beteiligung des dritten axonalen Verzweigungsmechanismus, der axonalen Bifurikation nachgewiesen werden.

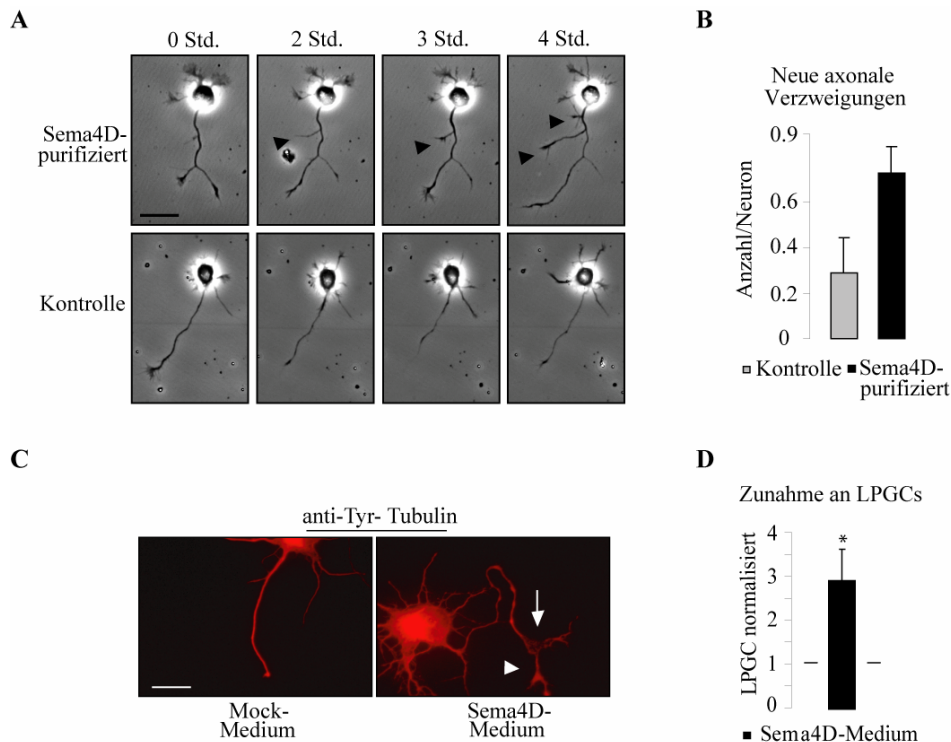


Abbildung 15: Mechanismen der Sema4D-induzierten axonalen Verzweigung: Sema4D steigerte die interstitielle axonale Verzweigung und führte zu einer erhöhten Anzahl komplexer pausierender Wachstumskegel („LPGC, large paused Growth cones“). A und B, Sema4D-purifiziert führte zu einem Anstieg axonaler Verzweigungen innerhalb von 4 Std.. Die Video-Mikroskopie Sema4D-behandelter hippocampaler Neurone zeigte das Wachstum neuer axonaler Verzweigungen direkt aus dem Axonschaft (Pfeilkopf, je Gruppen n = 15, aus 8 Experimenten). C und D, immunzytochemisch konnte auch eine Sema4D-induzierte Zunahme komplexer pausierender Wachstumskegel festgestellt werden (Pfeil), die zumeist mit neuen axonalen Verzweigungen einhergingen (Pfeilkopf, * p < 0.05, Student-t-Test, n > 60, aus 3 Experimenten). Maßstabsbalken = 40 µm (A), bzw. 20 µm (C).

4.3.4. Mechanismen der Sema4D-induzierten dendritischen Verzweigung

Die Behandlung primärer hippocampaler Neurone mit der Sema4D-purifiziert Präparation führte zu einer erhöhten Anzahl neuer Dendriten höherer Ordnung im Vergleich zu Neuronen, die mit der Kontrolle behandelt wurden (Abbildung 16B, p < 0.01). Mittels Video-Mikroskopie wurde beobachtet, dass die Applikation von Sema4D die Frequenz an Retraktionen und Elongationen der Dendriten steigerte. Unter diesen Bedingungen wuchsen dann vermehrt sekundäre Dendriten aus dem Schaft primärer Dendriten.

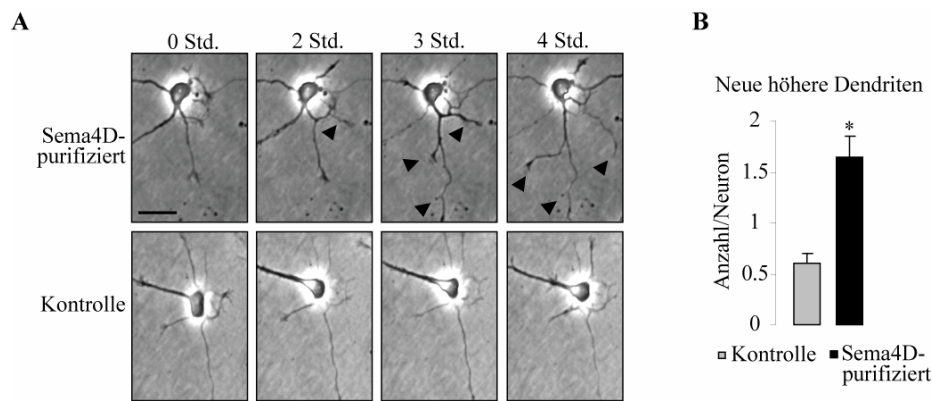


Abbildung 16: Mechanismen Sema4D-induzierter dendritischer Verzweigung. A, die Applikation von Sema4D führte zu einer erhöhten Frequenz an Retraktionen und Elongationen von Dendriten. In der Folge kam es zu einer erhöhten Ausbildung von sekundären und höheren dendritischen Verzweigungen. B, die Anzahl der neuen Dendriten zeigte sich in Sema4D-behandelten Kulturen im Vergleich zu Kontrolle-behandelten Kulturen signifikant erhöht (* $p < 0.01$, Student-t-Test, je Gruppe $n = 15$, aus 8 Experimenten). Maßstabsbalken = 40 μm .

4.4. Untersuchung der Signalwege der Sema4D-vermittelten Effekte

4.4.1. Plexin-B1 und Sema4D-induzierte Effekte in hippocampalen Neuronen

Sema4D kann neben Plexin-B1 auch CD72, den Sema4D-Rezeptor im Immunsystem, binden (Kapitel 1.2.3). Für CD72 wird aufgezeigt, dass der Rezeptor auch von neuronalen Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert wird (52). Zum Nachweis, dass bei den Sema4D-vermittelten Effekten tatsächlich Plexin-B1 als Rezeptor fungierte wurden Experimente mit Plexin-B1 Knockout-Mäusen durchgeführt. Dazu wurden Kulturen von primären hippocampalen Neuronen von Plexin-B1 Knockout-Mäusen ($plxnb1^{-/-}$) und Wildtyp-Mäusen ($plxnb1^{+/+}$) angelegt und diese für 4 Std. mit Sema4D-purifiziert oder Kontrolle behandelt.

Die primären hippocampalen Neurone aus $plxnb1^{-/-}$ Embryonen zeigten unter den Standard-Zellkulturbedingungen im Bezug auf die Anzahl und Morphologie ihrer Dendriten im Vergleich zu $plxnb1^{+/+}$ Neuronen keine Unterschiede. Die Applikation von Sema4D führte bei den $plxnb1^{+/+}$ Neuronen zu einer signifikanten Zunahme der dendritischen und axonalen Verzweigungen (Abbildung 17A und -B). Im Gegensatz dazu wurde bei den $plxnb1^{-/-}$ Neuronen keine Reaktion auf einen Sema4D-Stimulus festgestellt. Die Anzahl der axonalen und dendritischen Verzweigungen entsprach der Anzahl der Verzweigungen der Kontrollneuronen (Abbildung 17A und -B, $p = 0.773$ und $p = 0.153$). Dieses Resultat

verdeutlicht, dass der Sema4D-induzierte Effekt auf primäre hippocampale Neurone über die Aktivierung von Plexin-B1 transduziert werden konnte.

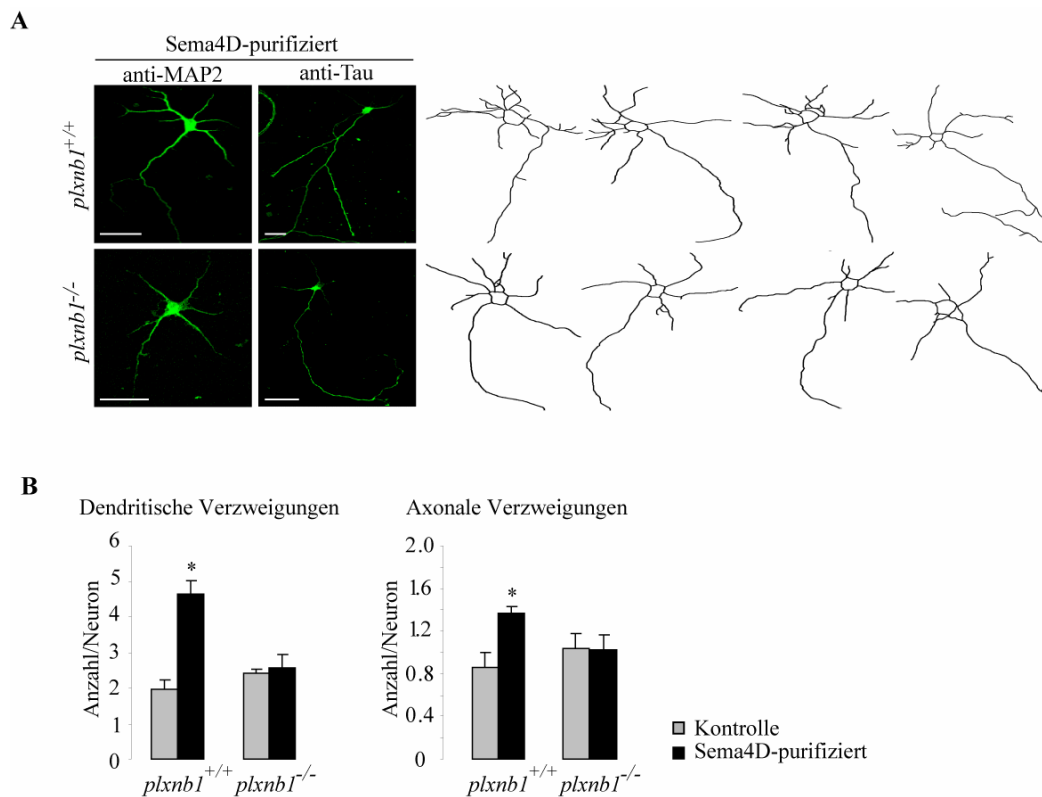


Abbildung 17: Plexin-B1 vermittelte Sema4D-induzierte Verzweigungseffekte in sich entwickelnden hippocampalen Neuronen. A und B, die Applikation von Sema4D führte im Gegensatz zu Neuronen von Wildtyp-Mäusen (*plxnb1*^{+/+}) zu keinem Effekt auf die Verzweigung von Dendriten und Axonen von hippocampalen Neuronen von Plexin-B1 Knockout-Mäusen (*plxnb1*^{-/-}). Typische Beispiele der neuronalen Morphologie werden unter A und die quantitative Auswertung unter B dargestellt (beide* $p < 0.01$, ANOVA gefolgt von einem post-hoc Fisher Test, je Gruppe $n > 60$, aus 3 Experimenten). Maßstabsbalken = 40 μm .

4.4.2. Interaktionspartner der Sema4D-Plexin-B1-vermittelten Effekte

Plexin-B1 kann, wie unter Kapitel 1.5 beschrieben, mit den Rezeptortyrosinkinasen Met und ErbB-2 Rezeptorkomplexe eingehen und Rho-Mediatoren binden. Die Beteiligung der beiden Rezeptortyrosinkinasen und RhoA an der Transduktion der Sema4D-vermittelten Effekt auf Dendriten und Axone wurde mit spezifischen Inhibitoren und der Applikation von Sema4D-Medium überprüft.

K-252a wird in etlichen Studien als ein Inhibitor der Rezeptortyrosinkinase Met in Dosen zwischen 30 und 300 nM angewendet (168), obgleich es in dieser Dosierung auch zu einer

Hemmung von Rezeptortyrosinkinasen der Trk-Familie kommen kann (169). Die Inkubation von primären hippocampalen Neuronen mit 200 nM K252a führte zu einer Blockade der Sema4D-vermittelten Effekte. Die Anzahl an dendritischen und axonalen Verzweigungen wurde im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen vermindert. (Abbildung 18A und -B für typische Beispielneurone, Abbildung 18D für die quantitative Auswertung; * $p = 0.001$ im Bezug auf axonale und dendritische Verzweigungen). Die gleiche Konzentration an K-252a führte auch an Mock-Medium behandelten Neuronen zu einer Abnahme der axonalen und dendritischen Verzweigungen (Abbildung 18D, * $p = 0.01$ für Axone und * $p = 0.05$ für Dendriten).

AG825, ein spezifischer Inhibitor der Rezeptortyrosinkinase ErbB-2, wurde in einer Konzentration von 1 μM zusammen mit Sema4D-Medium oder Mock-Medium eingesetzt. Die Gabe von AG825 zusammen mit Sema4D führte einzig zu einer Blockade der axonalen Verzweigungseffekte, nicht aber zu einer Blockade der dendritische Verzweigungen (Abbildung 18D, * $p = 0.004$ für Axone und * $p = 0.80$ für Dendriten). Die Länge von Axonen und Dendriten wurde weder durch K-252a noch AG825 signifikant beeinflusst (Abbildung 18D, in allen Fällen * $p > 0.05$).

Y-27632 inhibiert spezifisch die RhoA-abhängige Kinase (ROCK) in Konzentrationen bis 3 μM (170). Nach der Behandlung hippocampaler Neurone mit Y-27632 in einer Konzentration von bereits 1 μM wurde eine Blockade der Sema4D-vermittelten axonalen Verzweigungen beobachtet (Abbildung 18C für typische Beispielneurone und 18D für die quantitative Auswertung). Die Inhibition von ROCK resultierte in einem signifikanten Anstieg der axonalen Länge Sema4D-behandelter Neurone (* $p < 0.001$), während die Axonlänge in Kontrollkulturen unverändert blieb. Dies bedeutet, dass in dem verwendeten System nach einer Sema4D-vermittelten ROCK-Inhibition die axonale Länge zu Kosten der axonalen Verzweigung zunahm. Bei den in dieser Studie verwendeten Konzentrationen an Y-27632 konnten keine signifikanten Effekte auf die dendritischen Verzweigungen in Sema4D- oder Mock-Medium behandelten Neurone festgestellt werden (Abbildung 18D). Die Länge der Dendriten in den Kontrollkulturen nahm nach der Behandlung mit Y-27632 im geringen, aber signifikanten Maße ab, wohingegen in Kulturen, die mit Sema4D-Medium und Y-27632 behandelt wurden die durchschnittliche Länge der Dendriten zunahm (Abbildung 18D, * $p = 0.001$). Dies verdeutlicht, dass in diesen Experimenten die Sema4D-vermittelte RhoA-Aktivierung ein Sema4D-induziertes dendritisches Längewachstum blockierte.

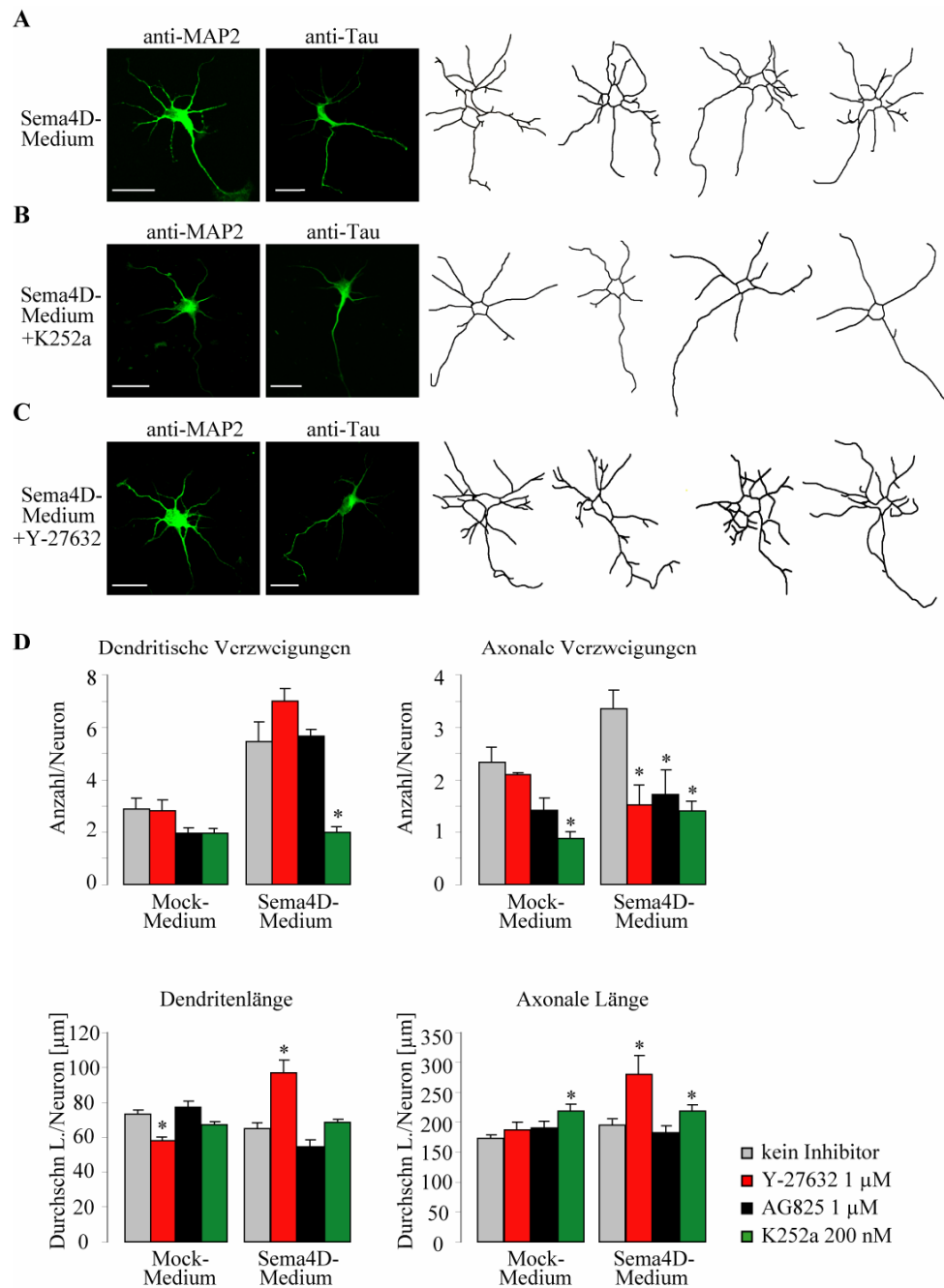


Abbildung 18: Effekte einer Inhibition der RhoA-abhängigen Kinase ROCK (via Y-27632) und der Rezeptortyrosinkinasen ErbB-2 (via AG825) und Met (via K-252a) auf die Sema4D-vermittelte Verzweigung in primären hippocampalen Neuronen. A-C, Fluoreszenzaufnahmen und Rekonstruktionen typischer Beispielneurone nach einer 4-stündigen Behandlung mit Sema4D-Medium in Gegenwart oder Abwesenheit der spezifischen Inhibitoren. Dendriten und Axone wurden durch eine immunzytochemische Färbung spezieller dendritischer und axonaler Markerproteine, MAP2 und Tau, unterschieden. D, quantitative Auswertung der Inhibitoreffekte auf axonale und dendritische Parameter von Sema4D-Medium oder Mock-Medium behandelten hippocampalen Neuronen. Eine Inhibition von ROCK blockierte die Ausbildung axonaler Verzweigungen, führte jedoch zu einem gesteigertem Längenwachstum von Neuriten bei Sema4D-behandelten Neuronen. Die Inhibition von Met blockierte die Verzweigung von Axonen Mock-Medium behandelter Neurone und von Axonen und Dendriten Sema4D-Medium-behandelter Neurone. Eine Inhibition von ErbB-2 blockierte

Sema4D-vermittelte Verzweigungen in Axonen, nicht aber in Dendriten (* $p < 0.05$ in allen Fällen, ANOVA gefolgt von einem post-hoc Fisher Test, je Gruppe $n > 60$, aus 3 Experimenten). Maßstabsbalken = 40 μm .

4.4.3. Die Rolle von Rezeptortyrosinkinasen-Effektoren

Aufgrund der Tatsache, dass Rezeptortyrosinkinasen bei den Sema4D-vermittelten Effekten auf hippocampale Neurone eine Rolle spielen (Kapitel 1.5.1), wurde bei den folgenden Experimenten die Beteiligung der den Rezeptortyrosinkinasen nachgeschalteten Signalkaskaden überprüft. Zu den Hauptsignalkaskaden zählen die PI3K-Akt-GSK3-beta und Grb2-Ras-MAPK Signalwege (171).

Die Applikation von PD98059, einem Inhibitor der MAP-Kinasen Erk1/2 („extracellular-signal regulated kinase“), in einer Konzentration von 50 μM hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die Sema4D-induzierte Verzweigung der Dendriten. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Neurone mit LY294002, einem Inhibitor der PI3K, in einer Konzentration von 10 μM zu einer starken Inhibition der Sema4D-vermittelten dendritischen Verzweigung der hippocampalen Neurone (Abbildung 18A, C und D, * $p = 0.002$). Kontrollkulturen wurden durch die Behandlung mit dem Inhibitor nicht in ihrem Wachstum beeinflusst. Sowohl PD98059 als auch LY294002 inhibierten die axonalen Verzweigungen in Sema4D-Medium und Mock-Medium behandelten Neuronen (Abbildung 18D, * $p = 0.001$). Folglich wurden Sema4D-induzierte Effekte auf die Verzweigung hippocampaler Neurone nur über eine Hemmung der PI3K aufgehoben.

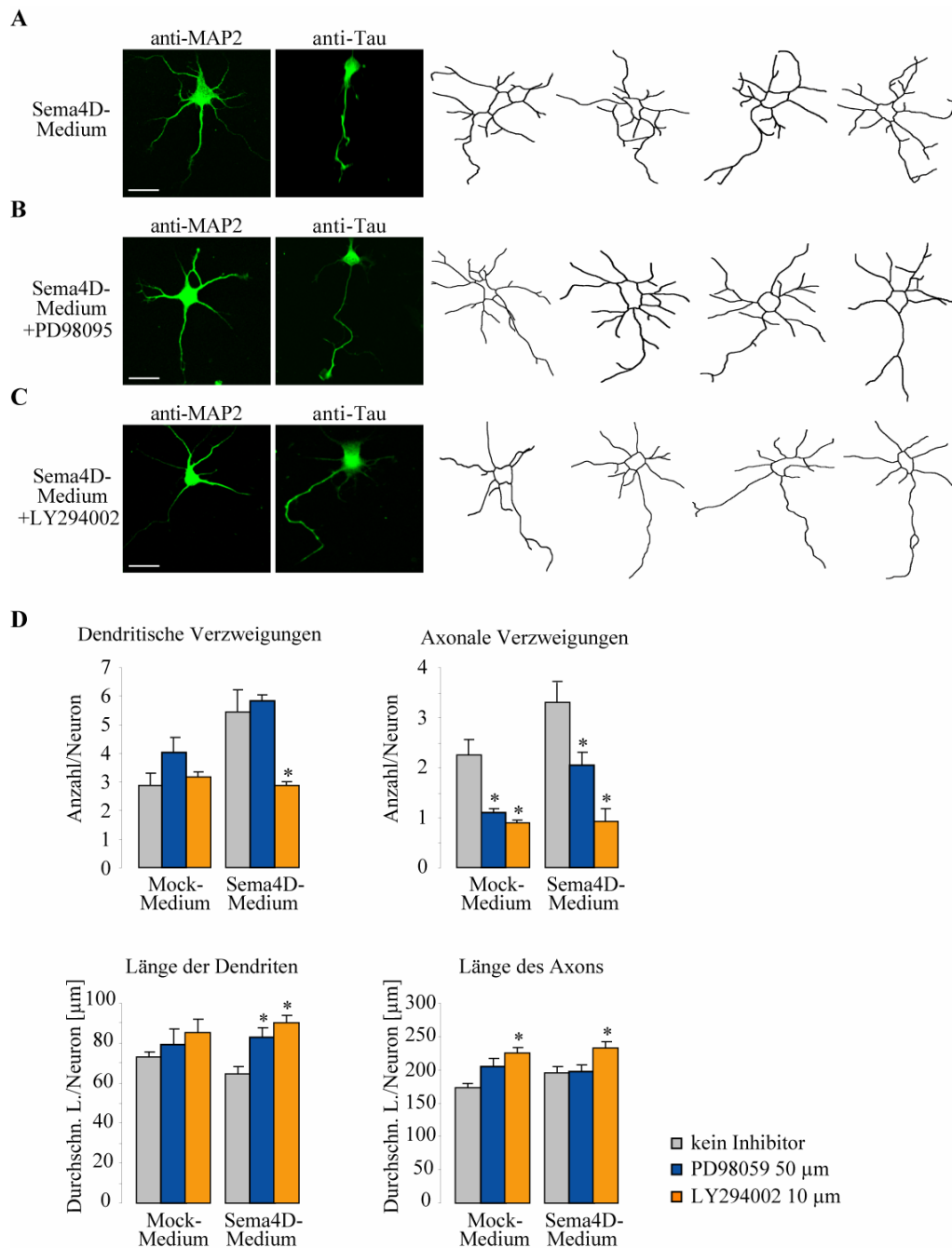


Abbildung 18: Effekte einer Inhibition von ERK1/2 MAPK (via PD98095) oder PI3K (via LY294002) auf Sema4D-vermittelte Verzweigungen in primären hippocampalen Neuronen. A-C, Fluoreszenzaufnahmen und Rekonstruktionen typischer Beispielsneurone nach der 4-stündigen Behandlung mit Sema4D-Medium in Gegenwart oder Abwesenheit der spezifischen Inhibitoren. Dendriten und Axone wurden durch eine immunzytochemische Färbung spezieller dendritischer und axonaler Markerproteine, MAP2 und Tau, unterschieden. D, quantitative Auswertung der Inhibitoreffekte auf axonale und dendritische Parameter von Sema4D-Medium oder Mock-Medium behandelten hippocampalen Neuronen. Eine Inhibition von ERK1/2 blockierte die axonalen Verzweigungen in Sema4D-Medium und Mock-Medium behandelten Kulturen, hatte aber keinen Effekt auf dendritische Verzweigungen. Eine Inhibition von PI3K führte zu einer Blockade der axonalen Verzweigungen in Kontroll-Kulturen und zu einer Blockade der axonalen und dendritischen Verzweigungen in Sema4D-behandelten Kulturen. (* $p < 0.05$ in allen Fällen, ANOVA gefolgt von einem post-hoc Fisher Test, je Gruppe $n > 60$, aus 3 Experimenten). Maßstabsbalken = 40 μm .

4.4.4. Der Einfluss von PI3K-Effektoren

4.4.4.1. GSK3-beta

GSK-3beta ist ein Substrat von Akt, einem der Haupteffektoren der PI3K. Bei einigen Studien wird für GSK-3beta eine Rolle bei der Entwicklung von Dendriten zugesprochen (z.B. 172). Ferner wird für GSK-3beta eine Rolle bei der axonalen Spezifizierung und Elongation beschrieben (173, 174) und erst kürzlich ist berichtet worden, dass Sema4D GSK-3beta über eine Dephosphorylierung von Serin-9 aktiviert und dass für diesen Effekt die RasGAP-Aktivität von Plexin-B1 benötigt wird (175). Aufgrund dieser Studien wurde überprüft, ob die Sema4D-induzierten axonalen und dendritischen Verzweigungen hippocampaler Neurone mit einer modulierten GSK-3beta-Aktivität in Verbindung gebracht werden konnten. Hierfür wurde zunächst ermittelt, ob eine Blockade von GSK3-beta zu einer Modifikation der Sema4D-induzierten Effekte in hippocampalen Neuronen führt. Lithiumionen blockieren in mikromolaren Konzentrationen GSK-3beta (176), erst in millimolarer Konzentration erfolgt eine Beeinflussung des Inositol Stoffwechsels (177).

LiCl in einer Konzentration von 20 μ M führte zu keiner signifikanten Veränderung der Sema4D-vermittelten Effekte auf axonale und dendritische Verzweigungen in primären hippocampalen Neuronen (Abbildung 19A). Um eine Beeinflussung von GSK-3beta durch Sema4D unter den gegebenen experimentellen Bedingungen zu überprüfen wurde mittels Western Blot der Phosphorylierungsstatus von GSK-3beta überprüft. In hippocampalen Neuronen konnte auch nach der Behandlung mit Sema4D-purifiziert oder der Kontrolle keine signifikante Änderung der Phosphorylierung von GSK-3beta an Serin-9 nach 15, 90 oder 180 Min. festgestellt werden (Abbildung 19B, ein Beispielblot und die quantitative Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten). Außerdem führte die Behandlung von Plexin-B1-exprimierenden HEK-Zellen mit Sema4D-purifiziert oder Kontrolle ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der GSK-3beta-Phosphorylierung an Serin-9.

Folglich konnte in dieser Studie weder eine Sema4D-induzierte Aktivierung von GSK-3beta über die Serin-9 Dephosphorylierung, noch eine funktionelle Beteiligung von GSK-3beta an der axonalen oder dendritischen Verzweigung hippocampaler Neurone festgestellt werden.

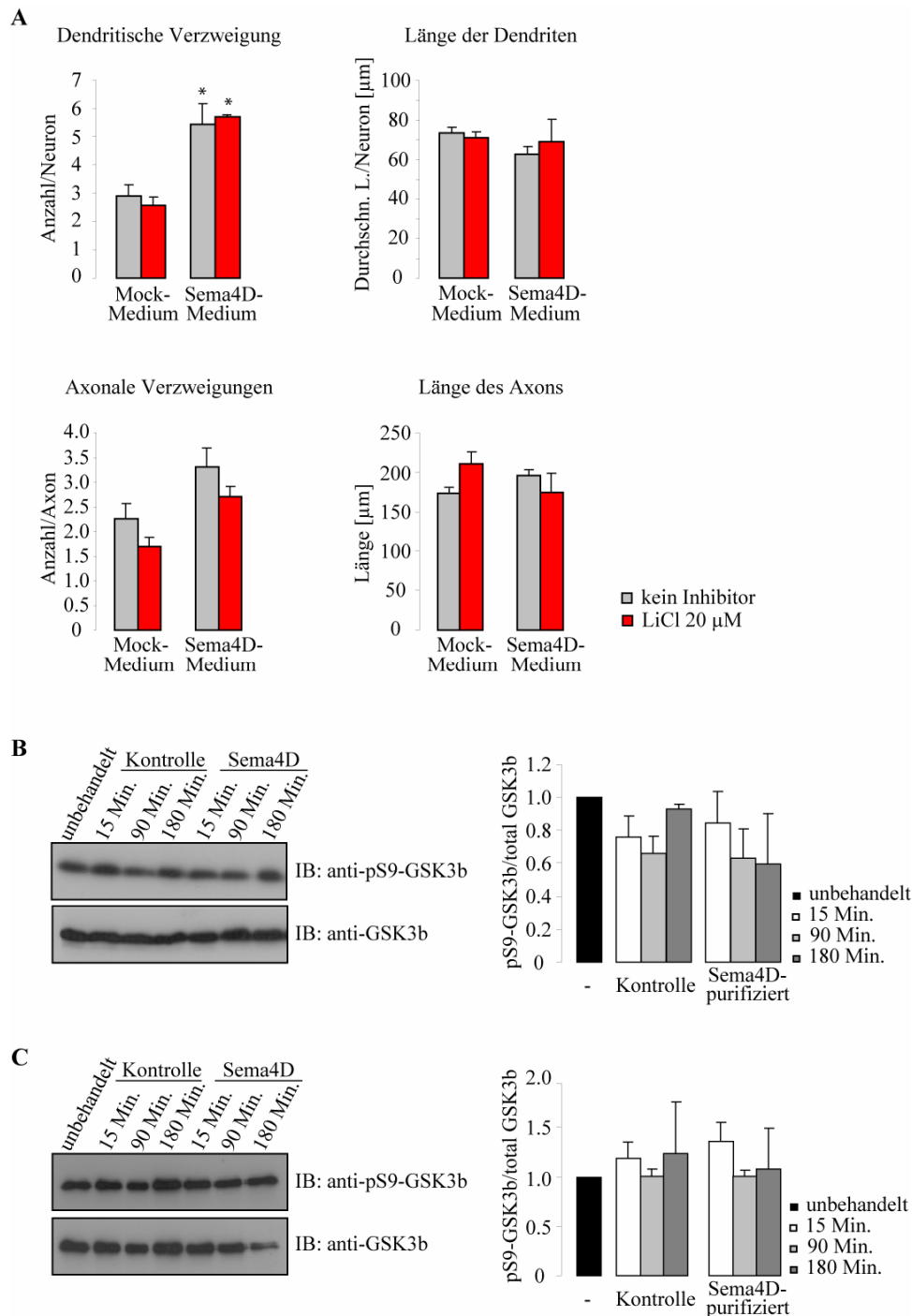


Abbildung 19: Die Rolle von GSK-3beta bei der Signaltransduktion von Sema4D-vermittelten Effekten in hippocampalen Neuronen und Plexin-B1-exprimierenden HEK-Zellen. A, die Inhibition von GSK-3beta durch LiCl führte zu keiner Beeinflussung der Sema4D-induzierten Effekte auf die Verzweigung von Dendriten hippocampaler Kulturen (beide * $p < 0.01$, ANOVA gefolgt von einem post-hoc Fisher Test, je Gruppe $n > 50$, aus 3 Experimenten). B und C, weder in hippocampalen Neuronen (B) noch in Plexin-B1- und PDZ-RhoGEF-überexprimierenden HEK-Zellen (C) führte die Behandlung mit Sema4D zu einer Beeinflussung der Phosphorylierung von GSK-3beta. Auf der linken Seite befinden sich typische Western Blots, rechts davon die Quantifizierung der Level an phosphorylierter GSK-3beta gegen totale GSK-3beta aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.4.4.2. mTOR

Bei mTOR, dem „mammalian target of rapamycin“, handelt es sich um einen weiteren Effektor des PI3K-Akt Signalwegs. Kürzlich ist gezeigt worden, dass mTOR die Morphogenese von Dendriten über die Beeinflussung der lokalen Translation in hippocampalen Neuronen reguliert (146, 147). Bisher sind Plexine jedoch noch nicht mit mTOR in Verbindung gebracht worden. Aufgrund der Tatsache, dass mTOR dendritisches Wachstum beeinflussen kann, ein Effektor der PI3K ist und dass Plexin-B1 in der Lage ist die PI3K zu modulieren (Kapitel 17), wurde eine mögliche Beteiligung von mTOR bei der Plexin-B1 Signaltransduktion überprüft. Hierfür wurde zunächst ein Augenmerk auf den Phosphorylierungsstatus von mTOR gelegt. In Plexin-B1 und PDZ-RhoGEF exprimierenden HEK-Zellen führte die Behandlung mit Sema4D zu einer Phosphorylierung von mTOR an Serin-2448 (Abbildung 20A, typischer Beispielblot; Abbildung 20B, Quantifizierung von phosphoryliertem mTOR gegen gesamt-mTOR aus 3 unabhängigen Zellkulturexperimenten). Die Sema4D-vermittelte mTOR-Phosphorylierung war bereits nach 15 Min. nachweisbar und erhöhte sich auf das 5-fache innerhalb von 90 Min. ($p = 0.003$, aus 3 unabhängigen Experimenten). An Serin-2448 phosphoryliertes mTOR ist aktiv und in der Lage das Wachstum von Dendriten zu beeinflussen (147). Diese Funktionalität wurde über die Inhibition von mTOR mit Rapamycin getestet.

Die Behandlung sich entwickelnder hippocampaler Neurone mit Rapamycin, einem spezifischen mTOR-Inhibitor, führte in einer Konzentration von 10 nM zu einer Blockade der Sema4D-induzierten Effekte auf axonale und dendritische Verzweigungen, das Längenwachstum der Neuriten wurde nicht beeinflusst (Abbildung 20C, Fluoreszenzbilder und Rekonstruktionen typischer Beispielneurone; Abbildung 20D, quantitative Auswertung). Aus diesen Beobachtungen folgte, dass mTOR mit den Sema4D-induzierten Verzweigungen von Axonen und Dendriten hippocampaler Neurone in direkter Verbindung stand.

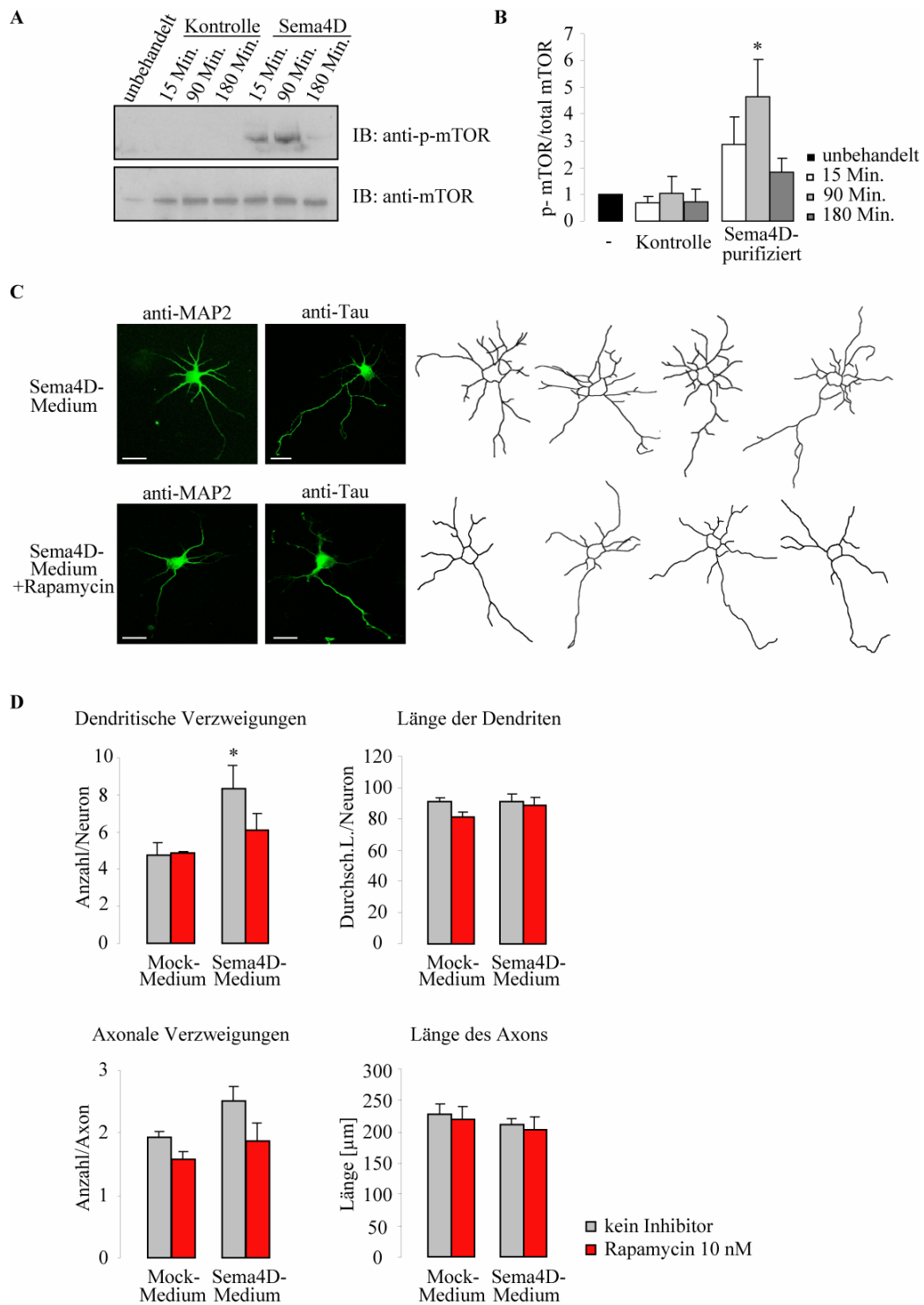


Abbildung 20: Die Rolle von mTOR bei den Sema4D-vermittelten axonalen und dendritischen Verzweigungen in primären hippocampalen Neuronen. A und B, die Behandlung von Plexin-B1- und PDZ-RhoGEF-überexprimierenden HEK-Zellen mit Sema4D resultierte in der Phosphorylierung von mTOR. Abbildung A zeigt ein typisches Beispiel eines Western Blots, Abbildung B zeigt die quantitative Auswertung von phosphoryliertem mTOR gegen gesamt-mTOR aus 3 unabhängigen Zellkulturexperimenten. Die Sema4D-induzierte Phosphorylierung begann bereits nach 15 Min. und erreichte nach 90 Min. ein signifikantes Maximum (* $p < 0.01$). C und D, typische Beispiele (C) und Quantifizierung (D) der inhibitorischen Wirkung von Rapamycin, einem spezifischen mTOR-Inhibitor, auf die Sema4D-vermittelten Verzweigungseffekte in

hippocampalen Neuronen (* $p < 0.05$, ANOVA gefolgt von einem post-hoc Fisher Test); Maßstabsbalken = 40 μm .

4.5. Kontrollexperimente

4.5.1. Untersuchung der Mock-Medium Präparation

Bei den mit der Sema4D-Medium Präparation durchgeführten Experimenten handelte es sich bei der Kontrolle um eine Mock-Medium Präparation. Beide Präparationen wurden aus dem Zellüberstand transfizierter HEK-Zellen gewonnen (Kapitel 3.13). Um den Einfluss möglicherweise endogen exprimierten Sema4Ds und weiterer, in der Mock-Medium Präparation aufkonzentrierter Substanzen zu testen, wurden hippocampale Neurone mit reinem Neurobasal-Medium (NB-Medium), Mock-Medium und Mock-Medium zusammen mit einem funktionsblockierenden Sema4D-Antikörper (Kapitel 2.2; 178) behandelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen mit NB-Medium und mit Mock-Medium behandelten Neuronen festgestellt werden. Der Einfluss zusätzlich aufkonzentrierter im Mock-Medium enthaltener Substanzen konnte somit ausgeschlossen werden. Außerdem wurden auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Mock-Medium und Mock-Medium mit Sema4D-Antikörper behandelter Neurone festgestellt, was einen möglichen Einfluss von endogen exprimiertem Sema4D ebenfalls ausschloss.

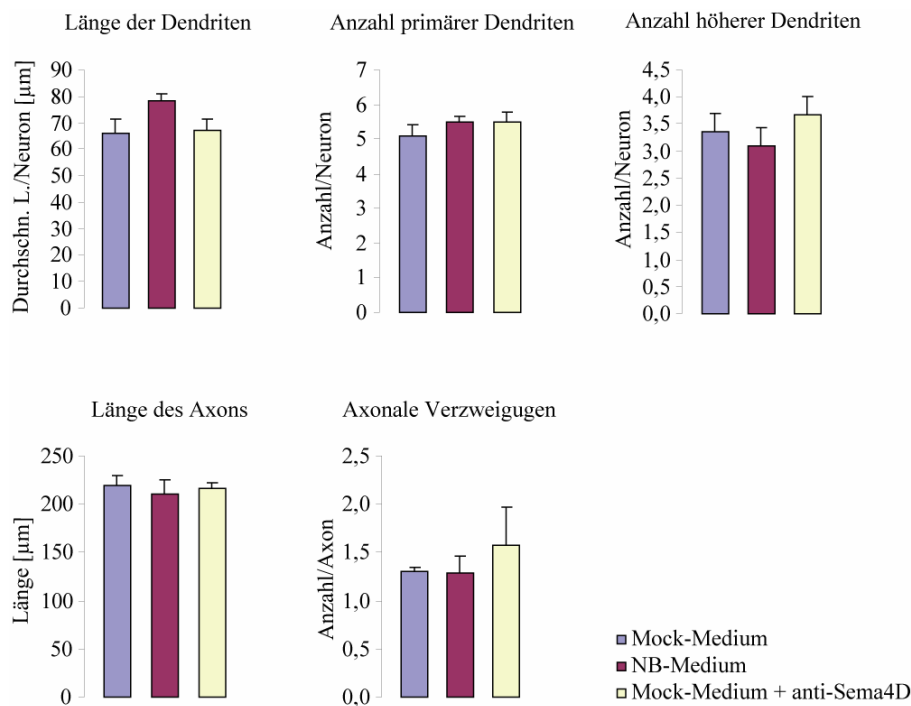


Abbildung 21: Die in der Mock-Medium Präparation aufkonzentrierten Substanzen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die axonalen und dendritischen Verzweigungen hippocampaler Neurone. Weder reines Neurobasal-Medium noch Mock-Medium, das mit einem Sema4D-Antikörper versetzt wurde, führte zu einer, im Vergleich zu Mock-Medium, reduzierten Anzahl dendritischer oder axonaler Verzweigungen in sich entwickelnden hippocampalen Neuronen (je Gruppe $n > 40$, aus 3 Experimenten).

4.5.2. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Verzweigung hippocampaler Neurone

Bei dem unter Kapitel 4.5 beschriebenen Experimenten wurden die jeweiligen Inhibitoren in dem Lösungsmittel DMSO verdünnt. In etlichen Studien wird darauf hingewiesen, dass DMSO bereits in geringer Konzentration das Wachstum von Neuronen beeinträchtigen kann. Um diesen Effekt bei den Inhibitor-Experimenten auszuschließen, wurden die Neurone zur Kontrolle mit den zur Lösung der jeweiligen Inhibitoren verwendeten Volumina an reinem DMSO versetzt und anschließend hinsichtlich ihrer Morphologie analysiert.

Bei sämtlichen verwendeten Volumina konnten keine signifikanten Unterschiede bei Axonen und Dendriten bezüglich der Länge oder Anzahl ihrer Verzweigungen festgestellt werden. Eine Beeinflussung der Morphologie durch das Lösungsmittel DMSO konnte bei den Inhibitor-Experimenten damit auch ausgeschlossen werden.

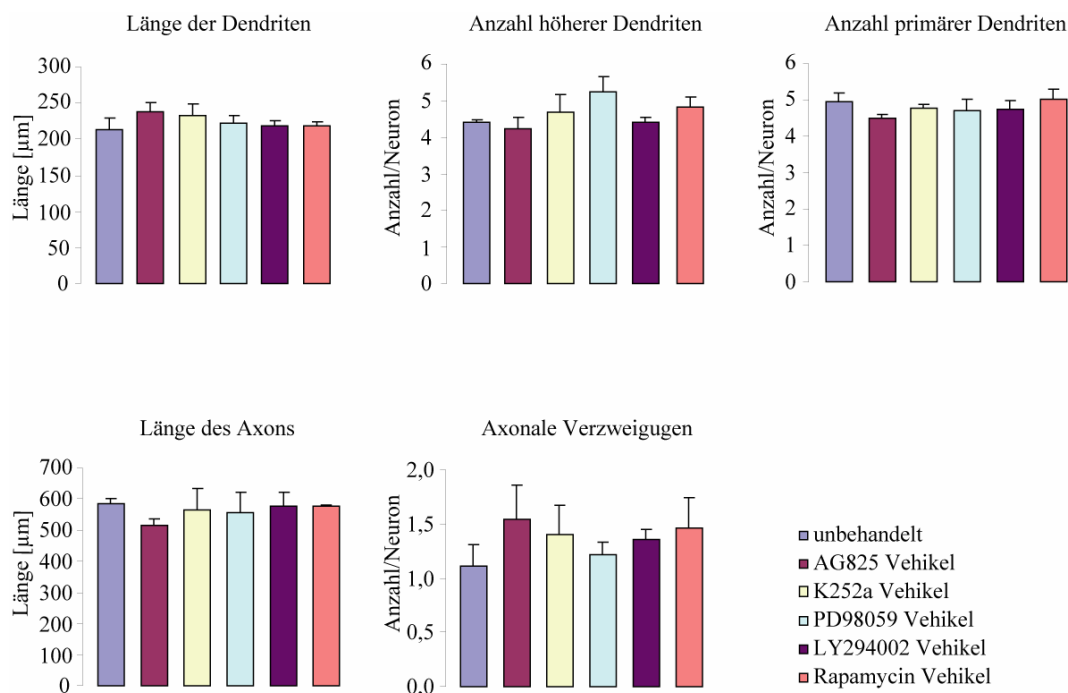


Abbildung 22: DMSO hat bei den verwendeten Volumina keinen signifikanten Einfluss auf die Morphologie sich entwickelnder hippocampaler Neurone. Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses des Lösungsmittels DMSO, in dem bei den Experimenten unter Kapitel 4.5 die Inhibitoren gelöst vorlagen, wurden die Neurone mit den jeweiligen Volumina DMSO ohne Inhibitor versetzt. Es konnten keine signifikante Beeinflussung auf das Längenwachstum oder die Verzweigungen von Axonen und Dendriten festgestellt werden (je Gruppe $n > 40$, aus 3 Experimenten).

4.6. Analyse organotypischer hippocampaler Kulturen von Plexin-B1 Knockout-Mäusen

Die Analyse und der Nachweis der Sema4D-vermittelten Verzweigungseffekte erfolgte in dissoziierten embryonalen hippocampalen Neuronen. Dabei wurden die Zellen in einer Konzentration ausplattiert, dass sie keine gegenseitigen Kontakte ausbildeten, damit die Morphologie der einzelnen Neuriten bestimmt werden konnte und eine Zuordnung der analysierten Neuriten zu den jeweiligen Nervenzellen möglich war. Um einen Einfluss der Sema4D-Plexin-B1 Interaktion in einem physiologischeren System zu überprüfen, wurde zusätzlich die Morphologie von Neuronen in organotypischen hippocampalen Kulturen am postnatalen Tag 5 von Plexin-B1 Knockout-Mäusen (*plxnb1*^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (*plxnb1*^{+/+}) analysiert. Die Mäuse stammten jeweils aus dem selben Wurf, der aus der Verpaarung von Plexin-B1 heterozygoten Mäusen hervorging. Die Darstellung der Neurone

erfolgte, wie unter Kapitel 3.21 beschrieben, über die DiI-Färbung durch eine Genkanone. An die Färbung schloss sich die Rekonstruktion und Analyse nach der Sholl-Methode an (Kapitel 3.25.3). Ferner wurde darauf geachtet, dass zur Analyse nur Pyramidalneurone der CA1-Region des Hippocampus herangezogen wurden.

Die Analyse der rekonstruierten hippocampalen Pyramidalneurone der CA-1-Region ergab keine offensichtlichen Unterschiede in der Verästelung der Neuriten zwischen *plxnb1*^{-/-} Mäusen und *plxnb1*^{+/+} Mäusen (Abbildung 23A). Die Quantifizierung der Verzweigungen nach Sholl brachte keinen signifikanten Unterschied zum Vorschein (Abbildung 23B). Bei dem initialen Anstieg der Verzweigungen handelte es sich um die basalen, am Soma gelegenen Dendriten und den längeren apikalen Dendriten. Die Verzweigungen der basalen Dendriten nahmen mit zunehmender Distanz zum Soma wieder ab. Die Messung der Verzweigungen des apikalen Dendriten wurde auf eine Distanz von 300 µm zum Soma begrenzt.

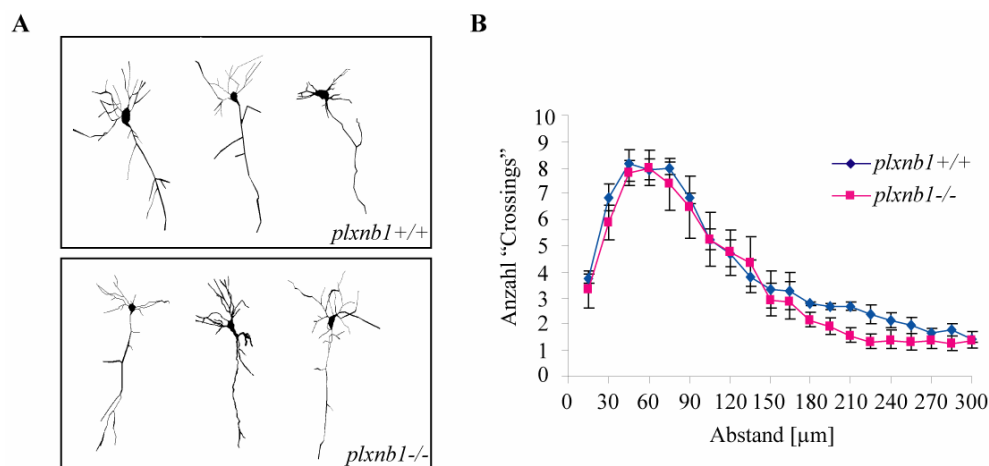


Abbildung 23: Analyse der Verzweigungen von Plexin-B1 Knockout-Mäusen (*plxnb1*^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (*plxnb1*^{+/+}) in organotypischen hippocampalen Kulturen. A, Rekonstruktion hippocampaler Pyramidalneurone der CA1-Region des Hippocampus. B, die quantitative Analyse der Verzweigungen nach Sholl erbrachte keine signifikanten Ergebnisse (je Gruppe n > 16, aus mindestens 5 Tieren).

4.7. Struktur des adulten Hippocampus in Plexin-B1 Knockout-Mäusen

Anhand spezifischer Markerproteine wurde überprüft, ob sich ein Fehlen des Sema4D-Rezeptors Plexin-B1 auf die Entwicklung des Hippocampus auswirkte. Hierfür wurden die Hippocampi von adulten Plexin-B1 Knockout-Mäusen (*plxnb1*^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen

(*plxnb1*^{+/+}) miteinander verglichen. Das Markerprotein NeuN („Neuronal Nuclei“), färbt spezifisch die Nuclei von Neuronen (179). In der Färbung sind die Zellkerne der Körnerzellen des Hippocampus, der Pyramidenzellen des Subikulums und der CA-Regionen deutlich zu erkennen (Abbildung 24, anti-NeuN, Pfeilkopf und Pfeil). Sowohl bei den Körnerzellen des Gyrus dentatus, als auch den Pyramidenzellen der CA-Regionen wurden keine Unterschiede zwischen *plxnb1*^{-/-} und *plxnb1*^{+/+} Mäusen festgestellt. Ein weiteres Markerprotein ist GFAP („Glial fibrillary acidic protein“), das saure Gliafaserprotein. Dieses Markerprotein färbt spezifisch Intermediärfilamente im Zytoplasma von Gliazellen, vor allem Astrozyten (180). Nach unseren Beobachtungen scheint die Verteilung von Gliazellen im adulten Hippocampus unabhängig von Sema4D, bzw. dem Plexin-B1-Rezeptor zu sein, da keine Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtyp-Mäusen erkennbar waren (Abbildung 24, anti-GFAP). Mit der Färbung des Markerproteins Calretinin erfolgte die Identifikation der Mooszellen in der Hilus-Region (Kapitel 1.6) des Gyrus dentatus (Abbildung 24, anti-Calretinin). Calretinin ist ein Calcium-bindendes Protein, das mit Calmodulin und Calbindin verwandt ist. Es wird neben den Mooszellen des Gyrus dentatus auch in Neuronengruppen der Hirnrinde, der Retina und im Rückenmark exprimiert (181). In der CA-Region wurden vereinzelt Calretinin-positive Zellen nachgewiesen (Abbildung 24, anti-Calretinin). Im Gyrus dentatus zeigte auch die innere molekulare Schicht eine ausgeprägte Färbung (Abbildung 24, anti-Calretinin, IMS). Diese Schicht besteht aus den Axonen der Mooszellen der Hilus-Region. Zwischen *plxnb1*^{-/-} und *plxnb1*^{+/+} Mäusen konnten keine Unterschiede innerhalb der Hilusregion und der inneren molekularen Schicht ermittelt werden. Auch die Verteilung der Calretinin-positiven Zellen in der CA-Region erschien ohne Unterschied. Mit dem Markerprotein Calbindin, einem weiteren Calcium-bindenden Protein (182), wurden die Körnerzellen des Gyrus dentatus genauer untersucht. Die ausgeprägte Färbung im Gyrus dentatus resultierte aus der Expression von Calbindin in den Dendriten der Körnerzellen. Diese Dendriten sind Bestandteil der äußeren molekularen Schicht (Kapitel 1.6, Abbildung 24, anti-Calbindin ÄMS). Die Axone der Körnerzellen, die Moosfasern, zeigten sich ebenfalls Calbindin-positiv. Dies war an der Färbung der Stratum lucidum, die unter der Pyramidenzellschicht der CA3-Region liegt, erkennbar (Kapitel 1.6, Abbildung 24, anti-Calbindin; Pfeil). Hier projizieren die Moosfasern auf die CA3-Pyramidalneurone. Neben den Körnerzellen waren auch einige Zellen in CA-Region Calbindin-positiv. Auch im Bezug auf die Projektionen der Körnerzellen und die Ausbildung der äußeren molekularen Schicht konnten in den *plxnb1*^{-/-} Mäusen keine Defizite festgestellt werden.

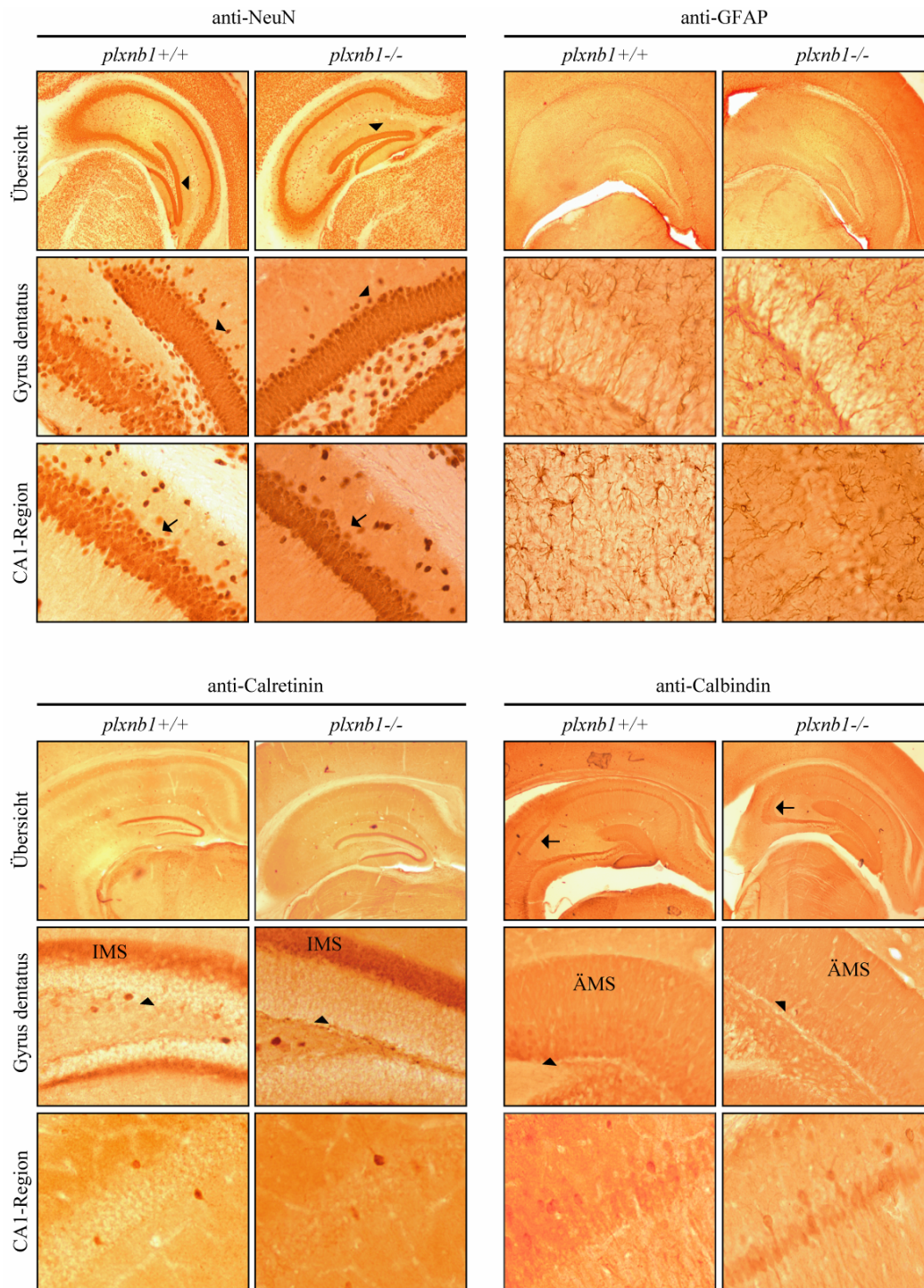


Abbildung 24: Untersuchung des adulten Hippocampus in *plxnb1*^{-/-} Mäusen. Es konnten keine Unterschiede in der Verteilung der NeuN positiven neuronalen Zellkerne (anti-NeuN, Pfeilkopf = Körnerzellen des Gyrus dentatus, Pfeil = Pyramidenzellen der CA1-Region), der GFAP-positiven Gliazellen, der Calretinin-positiven Mooszellen (anti-Calretinin, Pfeilkopf = ungefärbte Körnerzellen) oder der Calbindin-positiven Körnerzellen (anti-Calbindin, Pfeilkopf) zwischen *plxnb1*^{-/-} und *plxnb1*^{+/+} Mäusen festgestellt werden. Auch die aus Axonen der Mooszellen bestehende innere molekulare Schicht (IMS), die aus Dendriten der Körnerzellen bestehende äußere molekulare Schicht (ÄMS) und das aus den Axonen der Körnerzellen bestehende Stratum lucidum (anti-Calbindin, Pfeil) zeigten keine Unterschiede auf.

4.8. Die Rolle von Plexin-B2 im Hippocampus

Aufgrund des mangelnden Phänotyps der *plxnb1*^{-/-} Mäuse stellt sich die Frage, ob andere B-Plexine das Fehlen von Plexin-B1 kompensieren können. Aus der Familie der B-Plexine handelt es sich bei Plexin-B1 um den klassischen Sema4D-Rezeptor im zentralen Nervensystem (22, 94). Doch neben Plexin-B1 wird auch Plexin-B2 von Neuronen des ZNS exprimiert. Die Expression von Plexin-B3 beschränkt sich hingegen auf Oligodendrozyten (94). Es ist außerdem bereits gezeigt worden, dass Sema4D auch an Plexin-B2 binden kann, obgleich mit einer im Vergleich zu Plexin-B1 geringeren Affinität (178). Aus diesen Gründen wurde mit den folgenden Untersuchungen die Rolle von Plexin-B2 auf die Sema4D-vermittelten axonalen und dendritischen Verzweigungen sich entwickelnder hippocampaler Neurone eingehender untersucht.

4.8.1. Expressionsanalyse von Plexin-B2 im Hippocampus

Die Expressionsanalyse von Plexin-B2 erfolgte anhand einer Lac-Z Färbung einer *plxnb2lacZ/+* Mauslinie (Kapitel 2.8, Abbildung 25A) und durch eine *in-situ*-Hybridisierung (Abbildung 25B) von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen in der kritischen Phase der Entwicklung des Hippocampus, zwischen Stadium E17 und P5. Die *plxnb2lacZ/+* Mauslinie koexprimiert Plexin-B2 zusammen mit β -Galaktosidase, die histochemisch mit X-gal nachgewiesen wurde (Kapitel 3.23). Beide Methoden der Expressionsanalyse erbrachten ein übereinstimmendes Expressionsmuster von Plexin-B2 (Abbildung 25).

Im Stadium E17 erfolgte die Expression von Plexin-B2 mRNA und β -Galaktosidase in ähnlicher Weise wie die bereits unter Kapitel 4.1 beschriebene Expression von *plexin-B1* und *Sema4d*. So konnte β -Galaktosidase in den aus dem Kortex migrierenden Vorläuferzellen der Pyramidenzellen (Pfeilkopf), im Neuroepithelium (NE) und im Gyrus dentatus (DG) nachgewiesen werden. Zusätzlich erfolgte im hohen Maße eine Expression in den zum Gyrus dentatus migrierenden Vorläuferzellen der Körnerzellen. Die *in-situ*-Hybridisierung entsprach dieser Beobachtung und zeigte eine ausgeprägte Expression von *plexin-B2* mRNS im Gyrus dentatus. Im Stadium P5 wurde die Expression von β -Galaktosidase und von *plexin-B2* mRNS auf das Neuroepithel und den Gyrus dentatus begrenzt (Abbildung 25A und B, NE und DG).

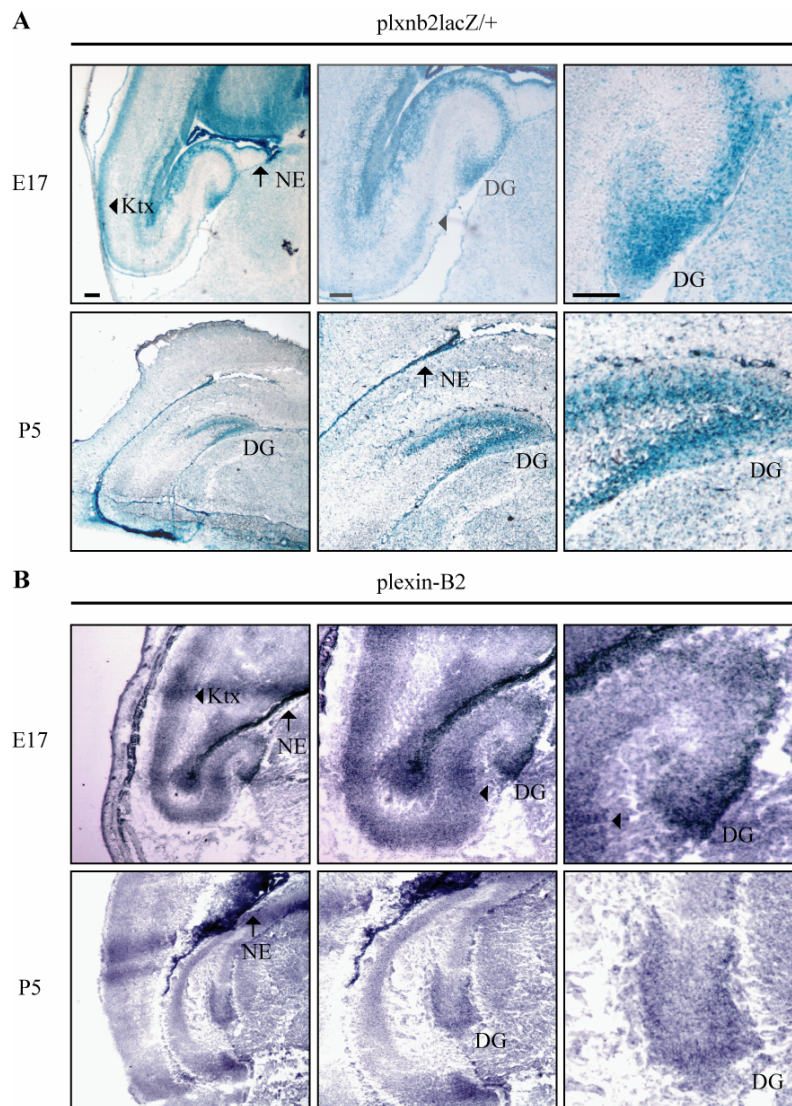


Abbildung 25: Expression von Plexin-B2 im sich entwickelnden Hippocampus. A, histochemische β -Galaktosidasefärbung einer *plxnb2lacZ/+* Mauslinie. β -Galaktosidase wurde im Stadium E17 von aus dem Kortex (Ktx) migrierenden Vorläufern der Pyramidenzellen (Pfeilkopf), im Neuroepithelium (NE) und im hohen Maße im Gyrus dentatus (DG) und den in den Gyrus dentatus migrierenden Vorläufern der Körnerzellen nachgewiesen. Am postnatalen Tag 5 begrenzte sich die β -Galaktosidaseexpression auf das Neuroepithelium und den Gyrus dentatus. B, die *in-situ*-Hybridisierung mit einer DIG-markierten Riboprobe bestätigte die unter A beobachtete Expression im Stadium E17 in den migrierenden Neuroblasten (Pfeilkopf), dem Neuroepithelium (NE) und Gyrus dentatus (DG) und die auf das Neuroepithelium und den Gyrus dentatus begrenzte Expression im Stadium P5. Maßstabsbalken = 200 μ m.

4.8.2. Plexin-B2 und Sema4D-vermittelte Effekte in hippocampalen Neuronen

In der Literatur wird beschrieben, dass sämtliche B-Plexine in der Lage sind RhoA zu aktivieren und mit den Rezeptortyrosinkinasen Met und ErbB-2 einem Rezeptorkomplex eingehen können (100-103). Um eine Beteiligung von Plexin-B2 bei den Sema4D-vermittelten Effekten auf hippocampale Neurone zu überprüfen, wurde dominant-negatives Plexin-B2 in dissoziierten Neuronen von *plxnb1*^{+/+} und *plxnb1*^{-/-} Mäusen überexprimiert und die Neurone mit Sema4D behandelt.

In einem Kontrollexperiment wurde dazu vorab das Konstrukt in myc-RhoA überexprimierenden HEK-Zellen getestet (Abbildung 26A). In dieser Zelllinie wird Plexin-B2, nicht aber Plexin-B1 endogen exprimiert. Nach der Behandlung mit Sema4D wurde bei nativen HEK-Zellen die Aktivierung von RhoA beobachtet, bei dn-Plexin-B2 überexprimierenden HEK-Zellen blieb diese Aktivierung aus (Abbildung 26A).

In hippocampalen Neuronen bewirkte die Applikation der Sema4D-purifiziert Präparation, wie bereits zuvor beobachtet, einen signifikanten Anstieg der dendritischen Verzweigungen, bei *plxnb1*^{+/+} Neuronen. Bei *plxnb1*^{-/-} Neuronen, die dn-Plexin-B2 exprimieren, blieb dieser Anstieg dagegen aus (Abbildung 26B). Dies verdeutlicht die Beteiligung von Plexin-B2 an den Sema4D-vermittelten Effekten in hippocampalen Neuronen. Interessanterweise führte sowohl das alleinige Fehlen von Plexin-B1 (Kapitel 4.4.1), als auch die Überexpression von dn-Plexin-B2 in *plxnb1*^{+/+} Neuronen zu einer vollständigen Aufhebung des Sema4D-Effekts. Bei den axonalen Verzweigungen konnte bei der verwendeten Sema4D-Konzentration von ca. 1,8 nM kein signifikanter Effekt beobachtet werden.

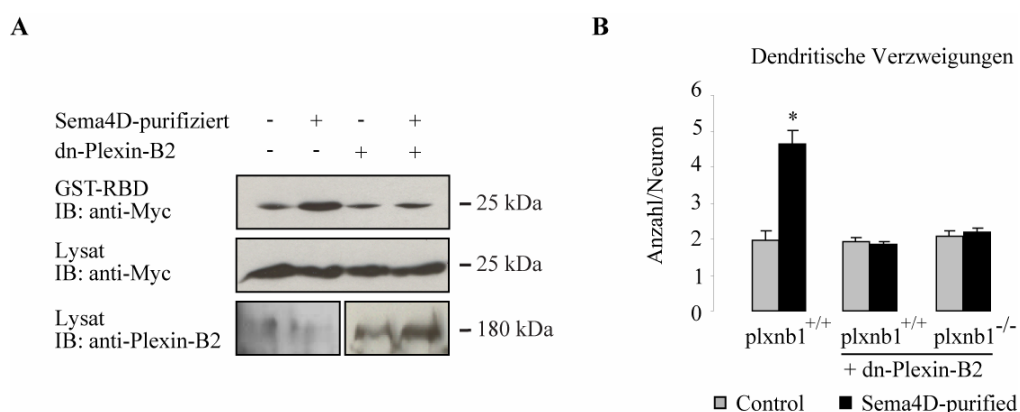


Abbildung 26: Die Rolle von Plexin-B2 bei Sema4D-vermittelte Effekten. A, in HEK-Zellen, die ein myc-RhoA Konstrukt überexprimierten, führte die Applikation von Sema4D zu einer Aktivierung von RhoA, bei der gleichzeitigen Überexpression von dn-Plexin-B2 blieb diese Aktivierung aus. Plexin-B2 war somit in der Lage in der Abwesenheit von Plexin-B1 RhoA zu aktivieren. B, in hippocampalen *plxnb1*^{+/+} Neuronen führte Sema4D

zu dem unter Kapitel 4.3 beschriebenen Anstieg dendritischer Verzweigungen (* $p = 0.003$). Die Expression von dn-Plexin-B2 in *plxnb1*^{+/+} Neuronen allein war ausreichend den Sem4D-Effekt zu blockieren (je Gruppe $n > 30$, aus 3 Experimenten).

4.8.3. Untersuchung von Plexin-B2 Knockout Mäusen

Die Expressionsanalyse in Kapitel 4.8.1 verdeutlicht, dass Plexin-B2 genau wie Plexin-B1 von den Vorläuferzellen der Pyramidenzellen exprimiert wurde und die Experimente unter Kapitel 4.8.2 zeigen, dass die Überexpression von dn-negativem Plexin-B2 ausreichte, um den Sema4D-Effekt auf dendritisches Wachstum in dissoziierten hippocampalen Kulturen aufzuheben. Anhand von *plxnb2*^{-/-} Mäusen wurde in den folgenden Experimenten überprüft, ob ein Fehlen von Plexin-B2 auf die Verästelung der Pyramidalneurone auswirkte. In 2 Studien wird aufgezeigt, dass bei Mäusen, in denen Plexin-B2 deletiert ist, zu einem hohen Prozentsatz ein Defekt bei dem Verschluss des Neuralrohrs vorliegt (183, 184). Die Folge ist eine Exenzephalie und die komplette Disorganisation des zentralen Nervensystems (Abbildung 27A; 183). Es zeigte sich, dass dieser Neuralrohrdefekt bei *plxnb2*^{-/-} Mäusen aus einem CD1 Hintergrund im Vergleich zum C57BL/6-Hintergrund weniger gehäuft auftrat. Aus diesem Grund wurden für die Experimente *plxnb2*^{-/-} Mäuse mit einem CD1-Hintergrund verwendet, da aufgrund des stark ausgeprägten Phänotyps nur ein Vergleich der Hippocampi von *plxnb2*^{-/-} Mäusen ohne Exenzephalie mit den Wildtyp-Mäusen möglich war. Zur Untersuchung wurden Pyramidalneurone der CA1-Region von Mäusen des Stadiums P5 herangezogen. Diese wurden mit einer Genkanone mit DiI gefärbt (Kapitel 3.21), rekonstruiert und nach der Sholl-Methode analysiert (Kapitel 3.25.3). Die Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede der Verästelungen der Neuriten zwischen Neuronen aus *plxnb2*^{-/-} und *plxnb2*^{+/+} Mäusen. Somit konnte sowohl bei *plxnb1*^{-/-} Mäusen (Kapitel 4.7), als auch bei *plxnb2*^{-/-} Mäusen keine Beeinträchtigung der Entwicklung hippocampaler Pyramidalneurone der CA1-Region festgestellt werden. Die Unterschiede in der Form der Sholl-Profile zwischen *plxnb1* und *plxnb2* Mäusen lagen in den verschiedenen genetischen Hintergründen der Mauslinien begründet.

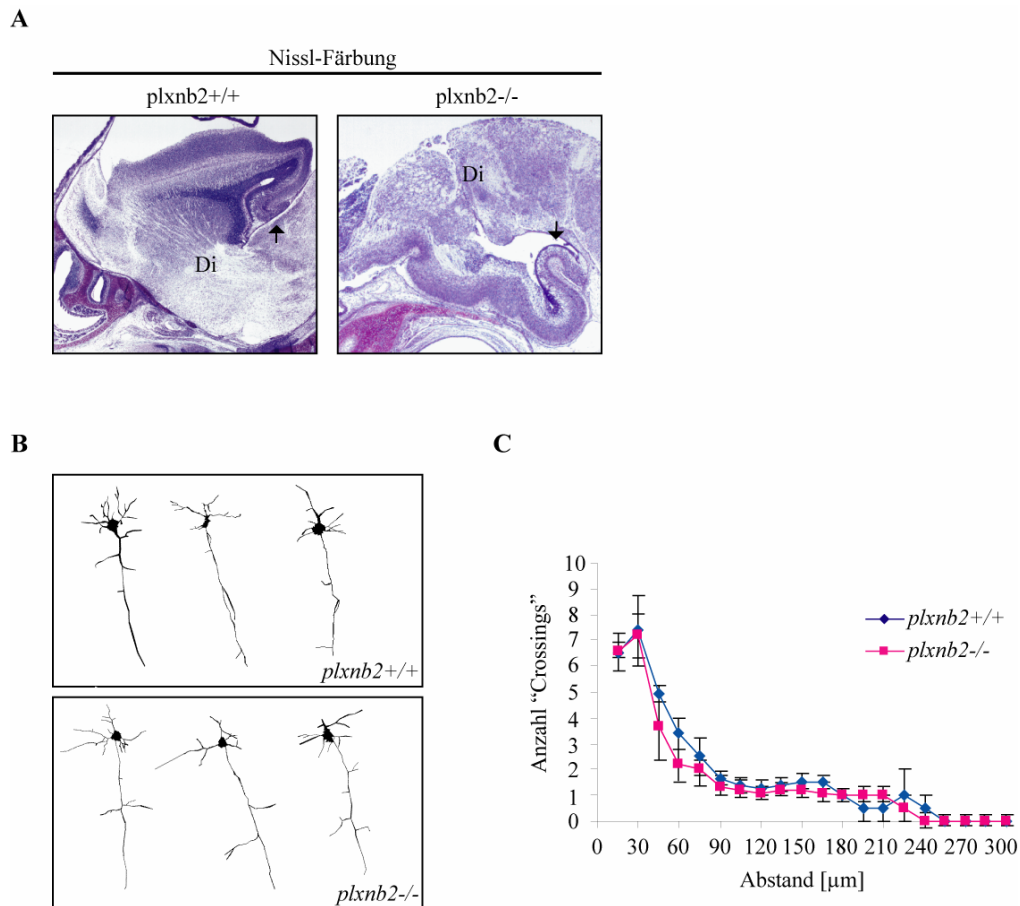


Abbildung 27: Untersuchung der Verzweigung von Pyramidalneuronen aus der CA1-Region des Hippocampus bei *plxnb2*^{-/-} Mäusen. A, *plxnb2*^{-/-} Mäuse bildeten zu einem hohen Prozentsatz einen Defekt bei dem Verschluss des Neuralrohrs aus, der sich in einer Exencephalie und einer invertierten Morphologie des ZNS äußerte. B, die Morphologie hippocampaler *plxnb2*^{-/-} und *plxnb2*^{+/+} Neurone der CA1-Region zeigte keine Unterschiede im Hinblick auf die Verästelung der Neuriten (je Gruppe n > 9, aus mindestens 3 Tieren).

4.9. Weitere Effekte von Sema4D auf die hippocampale Entwicklung

4.9.1. Entwicklung von Filopodien

Neben den beschriebenen Effekten von Sema4D auf die Länge und Verzweigung von Axonen und Dendriten zeigte die Behandlung der juvenilen hippocampalen Neurone mit Sema4D auch einen Effekt bei der Anzahl der Filopodien. Die Applikation von Sema4D-Medium führte innerhalb von 30 Min. zu einer erhöhten Ausbildung von Filopodien entlang der Neuriten (Abbildung 20A und C, * p < 0.05). Interessanterweise zeigten die entstandenen Filopodien an ihrem Ende eine positive immunzytochemische Reaktion für phosphoryliertes Met an Y1234 und Y1235 (Abbildung 20B). Es handelte sich um einen akuten Effekt, die

Analyse der Neurone nach einer 4-stündigen Behandlung mit Sema4D-Medium offenbarte keine, im Bezug auf Filopodien, signifikanten Unterschiede (vgl. Kapitel 4.3).

4.9.2. Entwicklung von Synapsen

Bei Filopodien handelt es sich, wie in Kapitel 1.7.5 beschrieben, um transiente unreife Fortsätze, die sich im Laufe der Entwicklung zu synaptischen Spines entwickeln können. Da Sema4D, wie oben dargestellt, einen Einfluss auf die Bildung von Filopodien ausübte, wurde anhand der unter Kapitel 4.4.1 beschriebenen Plexin-B1 Knockout- Mäusen überprüft, ob eine Deletion des Sema4D-Rezeptors einen Effekt auf die Entwicklung von Synapsen ausübte. Hierzu wurden die hippocampalen Neurone am embryonalen Tag 17 entnommen und 21 Tage kultiviert. Innerhalb dieses Zeitraums kommt es zur Ausbildung von Synapsen entlang der Neuriten und des Somas (185). Dendriten und Synapsen wurden immunzytochemisch auf die spezifischen Markerproteine MAP2 und Synaptophysin gefärbt und die Anzahl der Synapsen innerhalb eines 30µm langen Dendritenschafts ermittelt, der sich in direkter Nähe zum Somas befand (Abbildung 20D). Bei Synaptophysin handelt es sich um ein Glykoprotein, dass selektiv in synaptischen Vesikeln vorkommt (186). Die quantitative Analyse der Anzahl an Synaptophysin-positiven Synapsen erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Plexin-B1 Knockout-Mäusen (*plxnb1*^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (*plxnb1*^{+/+}) (Abbildung 20E). Der akute Effekt von Sema4D auf die Ausbildung von Filopodien nahm somit keinen Einfluss auf die Entwicklung von Spines und Synapsen.

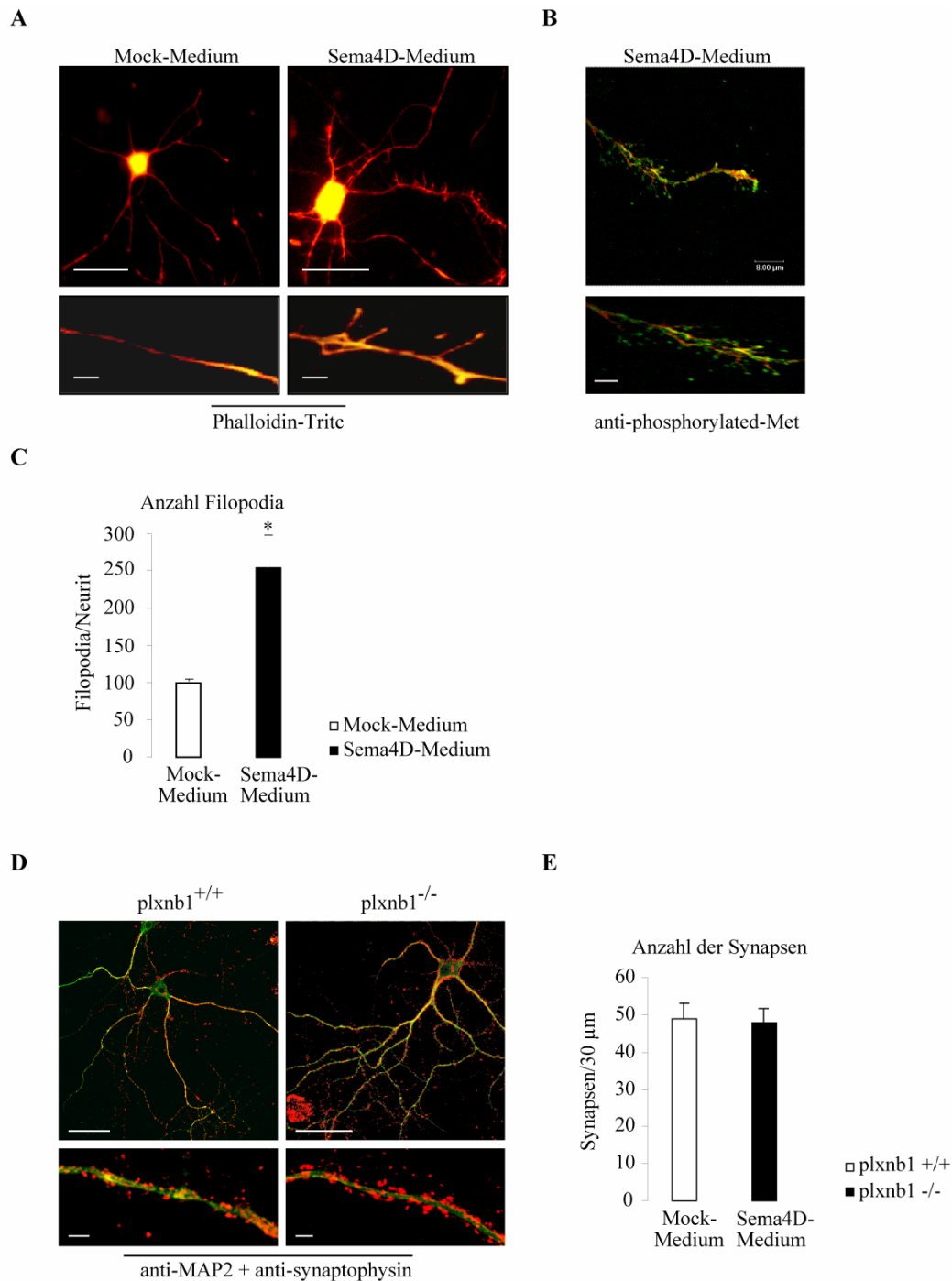


Abbildung 28: Die Behandlung juveniler hippocampaler Neurone mit Sema4D führte zu einem akuten Anstieg der Anzahl an Filopodien, die Anzahl der Spines und Synapsen reifer Neurone von Plexin-B1-Rezeptor Knockout-Mäusen blieb im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen jedoch unverändert. A und C, die Phalloidin-Färbung und Quantifizierung von Mock-Medium und Sema4D-Medium behandelten Neuroen zeigte einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Filopodien entlang der Neuriten (* $p < 0.05$). B, an der Spitze der Filopodien befand sich ein Pool an aktiviertem, phosphoryliertem Met. D und E, die Anzahl Synaptophysin-positiver Synapsen und Spines von Plexin-B1 Knockout-Mäusen (*plxnb1*^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (*plxnb1*^{+/+}) blieb unverändert (je Gruppe $n > 60$, aus 3 Experimenten). Maßstabsbalken in Nahaufnahmen = 5 μm , in den übrigen Aufnahmen = 40 μm

5. Diskussion

Die Entwicklung von Dendriten und Axonen ist ein Schlüsselschritt bei der Reifung von Neuronen und für ihre Funktion von entscheidender Bedeutung. Obwohl sich verschiedene Studien bereits mit der frühen Phase der axonalen Entwicklung und ihrer Navigation in die spezifischen Zielregionen beschäftigt haben, sind die molekularen Signalmediatoren und intrazellulären Signalwege, die initial die Entwicklung von Axonen und Dendriten leiten, noch nicht in einem ausreichendem Maße untersucht. In der vorliegenden Studie wurde das Semaphorin 4D mit der Modulierung der Komplexität von Axonen und Dendriten sich entwickelnder hippocampaler Neurone in Verbindung gebracht. Dieser Effekt stand mit einer Aktivierung von den B-Plexinen, Plexin-B1 und Plexin-B2, im Zusammenhang. Die Signaltransduktion erfolgte über die koordinierte Aktivierung des RhoA-ROCK-Signalwegs und des Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Signalwegs. Zudem konnte aufgezeigt werden, dass in Folge der Sema4D-Plexin-B Wechselwirkungen mTOR, ein Effektor des Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Signalwegs, aktiviert wurde.

5.1. Sema4D-vermittelte Effekte in hippocampalen Neuronen: der Kollaps axonaler Wachstumskegel und die Entwicklung axonaler und dendritischer Verzweigungen

Bisher wird eine Aktivierung von Plexin-B1 durch Sema4D mit einem akuten Kollaps von Wachstumskegeln sich entwickelnder hippocampaler Neurone in Verbindung gebracht. Dies ist insbesondere bei der klassischen Rolle von Semaphorinen, der kontaktvermittelten axonalen Navigation, von Bedeutung (Kapitel 1.3.1, 161, 187). Sema4D kommt jedoch neben seiner transmembranären Form auch als löslicher Ligand vor (22) und kann somit auch über größere Distanzen wirken um beispielsweise die Morphologie von Neuronen zu modulieren. In dieser Studie wurde aufgezeigt, dass hippocampale Pyramidalneuronen Plexin-B1, den Rezeptor, und Sema4D, seinen Liganden, über mehrere Tage zwischen einer späten embryonalen und frühen postnatalen Phase exprimieren, was möglicherweise bedeutet, dass Sema4D über einen autokrinen Mechanismus die Entwicklung der Neurone beeinflusst. Zu Beginn der Studie wurde daher vermutet, dass eine Sema4D-Plexin-B1 Wechselwirkung einen Effekt auf die Morphologie sich entwickelnder hippocampaler Neurone ausübt. Tatsächlich führte die Behandlung der Neurone mit löslichem Sema4D bereits in geringen nanomolaren Konzentrationen (ca. 1,8 nM) zu einem Anstieg der Verzweigungen von

Dendriten und in höheren Konzentrationen (ca.180 nM) auch zu einem Anstieg der axonalen Verzweigungen. Diese Effekte konnten innerhalb von 4 Std. nach der Applikation von Sema4D beobachtet werden. Das Ausmaß der Sema4D-induzierten dendritischen Verzweigungen umfasste ausschließlich sekundäre Dendriten und Dendriten höherer Ordnung. Die Anzahl der primären Dendriten wurde nicht beeinflusst. Die Funktion von Sema4D ist daher eher bei der Modulation und Entwicklung der dendritischen Komplexität, als der primären Neuritogenese einzuordnen. Interessanterweise führten die bei den experimentellen Bedingungen verwendeten Konzentrationen an Sema4D lediglich zu den beschriebenen Verzweigungseffekten, die Länge von Axonen und Dendriten blieb unbeeinflusst. Das verdeutlicht, dass es sich bei dem in verschiedenen Studien beschriebenen Effekt des Sema4D-induzierten Kollaps axonaler Wachstumskegel um ein höchstwahrscheinlich transientes Phänomen handelt, das funktionell eher dem Mechanismus der axonalen oder dendritischen Verzweigung, als der Verkürzung axonalen Wachstums zuzuordnen ist. Tatsächlich wurde bei den Video-Mikroskopiestudien nach der Sema4D-Applikation eine erhöhte Frequenz von Kollapsen axonaler und dendritischer Wachstumskegeln, gefolgt von Retraktionen und anschließenden erneuten Elongationen beobachtet. Während dieser Prozesse sprossen in erhöhtem Maße neue Verzweigungen aus dem Schaft von Axonen und Dendriten. Die Länge von Axonen und Dendriten blieb dabei im Vergleich zu Kontrollkulturen unbeeinflusst. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wird in einigen Studien aufgezeigt, dass ein Semaphorin-vermittelter Kollaps axonaler Wachstumskegel mit der Verzweigung retinaler Ganglionzellen bei *Xenopus*-Embryonen einhergeht (188). Weiterhin wird von einem Pausierverhalten von Wachstumskegeln vor der axonalen Verzweigung kortikaler Neurone berichtet (189). In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls ein erhöhtes Auftreten pausierender axonaler Wachstumskegel festgestellt werden, eine weitere Tatsache, die den Sema4D-Plexin-B1 Wechselwirkungen eine Rolle bei der Verzweigung hippocampaler Neurone zuspricht.

5.2. Die diversen Signalwege der B-Plexine und ihre Beeinflussung der Entwicklung hippocampaler Neurone

Die zellulären Funktionen von B-Plexinen in biologischen Systemen, einschließlich des Hippocampus, können aus verschiedenen Gründen sehr komplex sein.

Erstens können B-Plexine parallel verschiedene Signalwege aktivieren und steuern. Dies wird über die Beeinflussung der Aktivität von RhoGEFs und RhoGAPs, die den

Aktivierungszustand von RhoA und R-Ras, Rezeptortyrosinkinasen und verschiedener zytosolischer Kinasen, wie beispielsweise Pyk2, Src, FAK, PI3K und Akt regulieren, vermittelt (Kapitel 1.5.2, 76, 77, 80, 97, 100, 101, 105, 106). Diese Signalmediatoren werden von hippocampalen Neuronen exprimiert. Ihre differenzierte zeitliche und räumliche Aktivierung verleiht der funktionellen Rolle der Sema4D-Plexin-B Wechselwirkung in hippocampalen Neuronen eine enorme Komplexität.

Zweitens vermitteln mehrere dieser Signalmediatoren gegensätzliche Wirkung auf zelluläre Funktionen. Eine Aktivierung von RhoA führt beispielsweise zu einer Retraktion von Neuriten und zu einer Vereinfachung dendritischer Verzweigungen sich entwickelnder hippocampaler Neurone (Kapitel 1.7.3, 190), während eine Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, auch von Met, entwicklungsfördernd auf diese Neurone wirkt (143). Erst kürzlich ist nachgewiesen worden, dass in Abhängigkeit der Zusammensetzung des Semaphorinrezeptorkomplexes gegensätzliche Effekte bei der Motilität von Zellen bewirkt werden können. Tritt Plexin-B1 zusammen mit ErbB-2 auf, wird RhoA aktiviert, bei einem Rezeptorkomplex bestehend aus Plexin-B1 und Met, kommt es hingegen zu einer Inhibition von RhoA (97).

Und zum Dritten ist der Großteil der funktionellen Effekte der oben beschriebenen Signalmediatoren auf hippocampale Neurone aus Studien gewonnen worden, die auf einer länger andauernden Überexprimierung von konstitutiv-aktiven Rho GTPasen- oder Rezeptortyrosinkinasen-Mutanten basieren (112, 143, 190). Dieser experimentelle Ansatz erlaubt keine verlässlichen Rückschlüsse auf zelluläre Veränderungen in Neuronen, die durch örtlich und zeitlich begrenzte Aktivierung endogener Plexine hervorgerufen werden. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Studie die Beteiligung der Plexin-B-aktivierten Signalkaskaden, im Hinblick auf den Sema4D-vermittelten Effekt auf primäre hippocampale Neurone, untersucht.

5.3. Der Plexin-B-Rezeptorkomplex bei der Sema4D-vermittelten Verzweigung hippocampaler Neurone

Der Sema4D-induzierte Effekt der dendritischen Verzweigungen hippocampaler Neurone konnte durch die Kokultivierung mit K252a, einem Inhibitor von Met und TrkA Rezeptortyrosinkinasen, geblockt werden. Die Applikation von AG825, einem spezifischen Inhibitor der Rezeptortyrosinkinase ErbB-2 hatte keinen Einfluss auf die Verzweigungen der Dendriten. Interessanterweise fungiert der Ligand von Met, HGF, als ein Verzweigungsfaktor von Epithelzellen während der Organogenese und zudem bringen neuere Studien die HGF-

Met-Wechselwirkung mit der dendritischen Verzweigung hippocampaler Neurone in einen Zusammenhang (191). Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten bei Dendriten war bei den axonalen Effekten eine Aktivierung von ErbB-2, Met und ROCK erforderlich. Das deutet darauf hin, dass verschiedene für die Signaltransduktion notwendige Moleküle auf unterschiedliche Weise den Plexin-B-Rezeptorkomplex binden.

Die Beobachtung, dass eine Blockade von ROCK die Sema4D-vermittelten axonalen Verzweigungen inhibierte, erscheint unerwartet, da eine RhoA-Aktivierung klassischerweise mit einer Inhibition der Neuritenverzweigung in Verbindung gebracht wird (112, 190). Dennoch wurde in dieser Studie festgestellt, dass nach einer ROCK-Inhibition die Behandlung der Neurone mit Sema4D zu einer Elongation der Axone, auf Kosten der axonalen Verzweigung, führt. Zusammen mit der Tatsache, dass ROCK den Sema4D-vermittelten Kollaps axonaler Wachstumskegel transduzierte, legen beide Phänomene nahe, dass die Aktivierung von B-Plexinen einen Kollaps und das Pausieren der Wachstumskegel bewirkte, die axonale Elongation hemmte und dadurch die axonale Verzweigung über die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, wie etwa Met und ErbB-2, förderte.

Diese Studie zeigt auf, dass die unterschiedlichen molekularen Komponenten des Plexin-B-Signalkomplexes mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer koordinierten und aufeinander abgestimmten Weise funktionieren, um lokal die Verzweigung von Axonen und Dendriten zu steuern.

5.4. Die Signaltransduktion des Plexin-B-Rezeptorkomplexes bei den Sema4D-vermittelten Effekten auf hippocampale Neurone

Die Beobachtung, dass Rezeptortyrosinkinasen in dem Plexin-B-Rezeptorkomplex für eine Sema4D-vermittelte Verzweigung benötigt wurden, führt zu der Frage, welche der klassischen Rezeptortyrosinkinasen-vermittelten Signalwege, der PI3K-Akt-GSK-3beta- oder Ras-Raf-MAPK-Signalweg, diese zellulären Effekte steuern. Obwohl beide Signalwege bei der Regulation wachstumsfördernder Prozesse in sich entwickelnden hippocampalen Neuronen beschrieben werden (146), scheint ihre relative Beteiligung im hohen Maße von den übergeordneten Rezeptoren und den verwendeten Zellen abzuhängen. Weiterhin können die Signalwege entweder unabhängig voneinander oder koordiniert Signale transduzieren. So ist beispielsweise gezeigt worden, dass nur die gleichzeitige Inhibition des PI3K- und MAPK-Signalwegs zu einer Blockade der Ras und BDNF-vermittelten wachstumsfördernden Effekte auf Dendriten in primären hippocampalen Neuronen führt (146). Im Gegensatz dazu übt in

sich entwickelnden sensorischen Neuronen eine Inhibition des PI3K-Signalwegs im Vergleich zu einer Inhibition des MAPK-Signalwegs einen wesentlich höheren Einfluss auf die NGF- oder IGF-vermittelten Verzweigungen von Neuriten aus (192).

Im Falle der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PI3K im Gegensatz zu der Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinasen für die Sema4D-induzierten Verzweigungseffekte hippocampaler Neurone von wesentlich entscheidenderer Bedeutung war. Dies legt nahe, dass der Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Signalweg der Haupteffektor von Plexin-B1 in Dendriten sich entwickelnder hippocampaler Neurone ist. Interessanterweise führt auch die Überexprimierung von konstitutiv-aktiven Mutanten der PI3K in sich entwickelnden, nicht aber in ausgereiften hippocampalen Neuronen zu einer erhöhten Anzahl dendritischer Verzweigungen (147). Die Modulierung des Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Signalwegs durch B-Plexine wird in verschiedenen Studien beschrieben. Es handelt sich offensichtlich um einen komplexen und kontextabhängigen Vorgang, da in kontroverser Weise von einer negativen und positiven Beeinflussung berichtet wird. So aktiviert beispielsweise Sema4D Plexin-B1-abhängig den PI3K-Akt-Signalweg über eine Rekrutierung von Pyk2 und Src in Endothelzellen, unabhängig von der RasGAP-Aktivität von Plexin-B1 (193). Außerdem ist erst kürzlich beschrieben worden, dass Plexin-B1 in Endothelzellen über RhoA/ROCK Integrine reguliert und auf diese Weise Akt aktiviert (194). Im Gegensatz zu diesen eine positive Modulierung beschreibenden Studien wird auch berichtet, dass Sema4D über die Aktivierung der RasGAP-Aktivität von Plexin-B1 zu einer Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von Akt führt. Diese Inaktivierung hat die Inhibition der PI3K zur Folge und führt zum Kollaps axonaler Wachstumskegel in hippocampalen Neuronen (105, 175).

In dieser Studie wurde belegt, dass PI3K bei der Verzweigung von Dendriten durch Sema4D eher aktiviert, als inaktiviert vorliegt. So führte die Inhibition von PI3K zu einer Abnahme der Verzweigung von Neuriten und Sema4D aktivierte mTOR, einen Effektor des Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Signalwegs. Es erscheint daher durchaus möglich, dass Plexin-B1 über seine Ras-GAP-Aktivität oder alternativ über seine Rezeptortyrosinkinasen- und RhoA-abhängigen Signalwege in einem örtlich und zeitlich begrenzten Rahmen fungiert. Hierdurch kann die Aktivität der PI3K separat in axonalen Wachstumskegeln und in den Verzweigungspunkten von Neuriten reguliert werden. Das würde die Hypothese einer kontextabhängigen Signalweiterleitung der B-Plexine in biologischen Systemen stützen.

5.5. Die Rolle von GSK3-beta und mTOR als Effektoren des Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Akt Signalwegs

Eine Aktivierung des Rezeptortyrosinkinasen-PI3K-Akt Signalwegs über eine Plexin-B1-Aktivierung sollte erwartungsgemäß mit einer Phosphorylierung von GSK3-beta und damit der Inaktivierung von GSK3-beta, einhergehen. Tatsächlich ist eine Hemmung der GSK3-beta Aktivität ein wichtiger Schritt in der Regulierung der Axonspezifizierung und Initiierung des dendritischen Wachstums in mehreren neuronalen Zellkulturmodellen, einschließlich in hippocampalen Neuronen (172-174). Auf der einen Seite könnte daher die Sema4D-vermittelte Verzweigung von Dendriten auf einer Inaktivierung von GSK3-beta, als Effektor des Plexin-B-PI3K-Akt-Signalwegs, beruhen. Auf der anderen Seite zeigen erst kürzlich veröffentlichte Studien, dass eine Sema4D-Plexin-B1 Interaktion GSK3-beta über die Ras GAP Aktivität von Plexin-B1 zu aktivieren vermag (175). In dieser Studie konnte bei den vorliegenden experimentellen Bedingungen weder in HEK-Zellen noch in hippocampalen Neuronen eine Sema4D-bedingte Änderung des Phosphorylierungsstatus von GSK3-beta festgestellt werden. Dies war möglicherweise Ausdruck einer gegenseitigen Kompensation, die durch die gleichzeitige Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen- und R-RasGAP-abhängigen Signalwege des B-Plexinrezeptorkomplexes stattfand. Außerdem hatte eine Inhibition von GSK3-beta durch LiCl keinen Einfluss auf die Sema4D-induzierten Verzweigungseffekte in hippocampalen Neuronen.

Statt dessen wurde ein weiterer Effektor von Akt, mTOR, durch Sema4D spezifisch phosphoryliert und gewann bei der Sema4D-vermittelten Verzweigung hippocampaler Neurone an Bedeutung. Eine Inhibition von mTOR durch Rapamycin führte zu einer Blockade der Sema4D-induzierten Verzweigungen.

Es handelt sich hierbei um die erste Studie, die eine Verbindung zwischen mTOR und der Signaltransduktion von B-Plexinen aufzeigt. Neuere Studien unterstreichen die Bedeutung von mTOR bei der Entwicklung von Dendriten und Synapsen, die durch diverse Mediatoren, beispielsweise BDNF („brain derived neurotrophic factor“), Reelin und dem neuronalen EGF-Familienmitglied CALEB/NGC reguliert werden (195-197). Demnach scheint mTOR eine Schlüsselfunktion für verschiedene Signalwege bei der Regulation der dendritischen Morphogenese und der neuronalen Reifung zu besitzen. Ein wichtiger Aspekt für die zelluläre Wirkweise von mTOR liegt in seiner Fähigkeit, die Translation zu initiieren. Durch verschiedene Signalkaskaden kann global oder lokal die Translation über mTOR beeinflusst werden (198). Diese Beobachtung eröffnet eine neue Dimension der B-Plexin-

Signaltransduktion. Zusätzlich zu der lokalen Kontrolle und Beeinflussung des Aktin- und Mikrotubulin-Zytoskeletts über Rho GTPasen können B-Plexine auch einen biologischen Effekt über die globale und lokale Translation von Proteinen durch eine Regulation der mTOR-Aktivität ausüben. Tatsächlich weisen einige Studien darauf hin, dass eine PI3K-Akt-mTOR-regulierte Translation lokal in Dendriten stattfindet (199). Diese Beobachtungen machen den PI3K-Akt-mTOR Signalweg bei der Sema4D-vermittelten Verzweigung sich entwickelnder hippocampaler Neurone zu einem idealen Partner des Plexin-B-Rezeptorkomplexes.

5.6. Plexin-B2 und mögliche Kompensationsmechanismen bei der Entwicklung

Für Plexin-B2 konnte eine Expression in der kritischen Phase der hippocampalen Entwicklung zwischen E17 und P5 in den migrierenden Vorläufern der Pyramidenzellen, dem Gyrus dentatus und den migrierenden Vorläufern der Körnerzellen des Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Die Expression entsprach abgesehen von den migrierenden Körnerzellenvorläufern der Expression von Plexin-B1 und Sema4D. Es stellt sich die Frage, ob Plexin-B2 neben seinen bereits untersuchten Einfluss auf die Entwicklung und Migration von Körnerzellen (183, 184), auch einen Einfluss auf die Verzweigung hippocampaler Neurone ausübt. Dafür spricht neben den überlappenden Expressionsmustern zwischen Plexin-B1 und Plexin-B2 auch die Tatsache, dass beide B-Plexine zur gleichen Proteinfamilie gehören und in der Lage sind die selben Signalkaskaden zu aktivieren (100-103). Außerdem ist gezeigt worden, dass Plexin-B2 Sema4D binden kann (178), obgleich auch in einer geringeren Affinität als Sema4C, den endogenen Liganden von Plexin-B2 (183). Tatsächlich wurde in dieser Studie auch belegt, dass Sema4D über Plexin-B2 RhoA aktivieren konnte (Kapitel 4.8.2). Weiterhin führte die Überexprimierung eines dn-Plexin-B2 Konstrukts in dissoziierten hippocampalen Neuronen zu einer Inhibition der Sema4D-vermittelten Effekte auf die dendritischen Verzweigungen. Dennoch wurden sowohl bei *plxnb1*^{-/-}, als auch bei *plxnb2*^{-/-} Mäusen keine Defizite in der Entwicklung hippocampaler CA1-Pyramidalneuronen festgestellt. Ein Unterschied zwischen den Species Ratte und Maus kann ausgeschlossen werden, da in Kapitel 4.4 und 4.8.2 aufgezeigt wurde, dass Sema4D auch bei hippocampalen Neuronen der *plxnb1*^{+/+} Maus die beschriebenen Effekte zeigte. Prinzipiell kann auch eine gegenseitige Kompensation von Plexin-B1 und Plexin-B2 ausgeschlossen werden, da in dissoziierten hippocampalen Kulturen das Fehlen von einem der beiden Plexine ausreichte, um die Sema4D-induzierten Effekte vollständig zu blockieren (Kapitel 4.4 und 4.8.2).

Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass die Morphogenese, als ein essentieller Schritt der Entwicklung von Neuronen *in vivo*, von mehr als einem Faktor abhängt und die *in vitro*, bei den dissoziierten Neuronen, beobachteten Effekte kompensiert werden konnten. Ferner kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression von Plexinen für die Verzweigung hippocampaler Pyramidalneurone der CA1-Region nicht von Bedeutung ist. Kompensationsmechanismen zwischen dissoziierten Neuronen und im Zellverbund befindlichen Neuronen organotypischer Kulturen werden in der Literatur beschrieben, so wird beispielsweise auch für die Überexpression von dn-Rho in dissoziierten hippocampalen Kulturen nachgewiesen, dass sie die Entwicklung und den Auswuchs von Dendriten fördert (129), in organotypischen hippocampalen Kulturen jedoch keinen Effekt auf die Pyramidalneurone ausübt (112, 139).

5.7. Weitere Effekte von Sema4D auf hippocampale Neurone

Die Behandlung embryonaler hippocampaler Neurone mit Sema4D führte innerhalb kurzer Zeit zu einem Anstieg an Filopodien entlang der Neuriten. Bei Filopodien handelt es sich um hochmotile, aus Aktin bestehende Fortsätze, deren Länge zwischen 5 und 35 μm beträgt. In sich entwickelnden Axonen befinden sich Filopodien an der Spitze der Wachstumskegel und spielen möglicherweise bei der axonalen Zielführung eine Rolle. Dendritische Filopodien sind bei der Synaptogenese von Bedeutung, sie gelten als Vorläufer bei der Ausbildung von Spines (Kapitel 1.7.5, 200, 201).

In Zelllinien und nicht-neuronalen Primärzellen geht die Formation von Filopodien in der Regel mit einer Aktivierung der GTPase Cdc42 einher (202). In hippocampalen Neuronen hingegen scheint Cdc42 im Bezug auf die Entwicklung von Filopodien und Spines eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. So führt die Überexpression von konstitutiv-aktivem Cdc42 in hippocampalen Pyramidalneuronen zu keiner Beeinflussung der Spineanzahl. Ebenso zeigt die Expression von dominant-negativem Cdc42 keine signifikanten Effekte auf die Morphologie und Anzahl der Spines (203). Die GTPasen Rho und Rac1 sind hingegen maßgeblich an der Spineentwicklung und Spineerhaltung beteiligt. Eine Überexpression von einem konstitutiv-aktivem Rho Konstrukt reduziert die Spineanzahl und Spinelänge, eine Inhibition von Rac1 führt zu einer Abnahme der Spinezahl in hippocampalen Neuronen (139, 203). Kürzlich ist das Semaphorin 4D mit der Entwicklung von Spines und Synapsen in einen Zusammenhang gebracht worden. Zum einen führt die Behandlung hippocampaler Neurone mit shRNS gegen Sema4D zu einer signifikanten Abnahme gabaerger Synapsen, während die

glutamatergen, auf Spines befindlichen Synapsen in ihrer Anzahl unverändert bleiben (204). Zum anderen bewirkt die Applikation von Sema4D in hippocampalen Neuronen eine Aktivierung von RhoA, die wiederum in einer Erhöhung der Spineanzahl und einer veränderten Spineform resultiert (159). Beide Studien beschreiben einen positiv-regulierenden Einfluss von Sema4D auf die Entwicklung von Synapsen, wobei die erste Studie einen Anstieg glutamaterger Synapsen ausschließt. Dies steht im Widerspruch zu der zweiten Studie, da Spines glutamaterge Synapsen tragen (Kapitel 1.7.5) und somit der Sema4D-induzierte Anstieg an Spines ein Anstieg glutamaterger Synapsen bedeutet.

Der Sema4D-induzierte Anstieg an Spines würde zu dem in dieser Arbeit beobachteten Anstieg der Anzahl an Filopodien, den Spinevorläufern, passen, steht aber im Gegensatz zu den früheren Studien, die eine RhoA-Aktivierung mit einer verminderten Anzahl an Spines in Verbindung bringen (139, 203). Außerdem handelt es sich bei dem beobachteten Phänomen der erhöhten Anzahl an Filopodien um einen akuten Effekt, die Ausbildung von Spines erstreckt sich über einen Zeitraum von mehreren Wochen.

Aufgrund dieser Diskrepanzen wurde anhand von Plexin-B1 Knockout-Mäusen überprüft, ob der beobachtete Anstieg an Filopodien mit der Entwicklung von Spines in einem Zusammenhang steht und inwieweit durch ein Fehlen des Sema4D-Rezeptors die Ausbildung von Spines und Synapsen beeinträchtigt wurde. Hierzu wurden embryonale hippocampale Neurone über einen Zeitraum von 24 Tagen kultiviert und die Anzahl der Synaptophysin-positiven Synapsen überprüft. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, es konnte somit keine Beteiligung von Sema4D bei der Synaptogenese festgestellt werden. Möglicherweise wird das Fehlen von Plexin-B1 bei der Spineentwicklung durch andere Faktoren kompensiert, vielleicht spielt aber auch das Sema4D-induzierte Auftreten von Filopodien eine Rolle bei der Verzweigung der Neuriten. Interessanterweise wurde in dieser Studie festgestellt, dass neben der erhöhte Anzahl an Filopodia, diese auch in ihrer Spitze phosphoryliertes Met aufweisen. Met spielt, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, eine entscheidenden Rolle bei der Sema4D-vermittelten Verzweigung von hippocampalen Neuronen. Möglicherweise sind Filopodien nicht nur bei der axonalen Wegleitung und Spineentwicklung, sondern auch bei der Entstehung neuer Verzweigungen beteiligt.

6. Literaturverzeichnis

1. Gherardi, E., C.A. Love, R.M. Esnouf, and E.Y. Jones, *The sema domain*. *Curr Opin Struct Biol*, 2004. **14**(6): p. 669-78.
2. Tran, T.S., A.L. Kolodkin, and R. Bharadwaj, *Semaphorin regulation of cellular morphology*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 263-92.
3. Wang, L.H., R.G. Kalb, and S.M. Strittmatter, *A PDZ protein regulates the distribution of the transmembrane semaphorin, M-SemF*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 14137-46.
4. Schultze, W., V. Eulenburg, V. Lessmann, L. Herrmann, T. Dittmar, E.D. Gundelfinger, R. Heumann, and K.S. Erdmann, *Semaphorin4F interacts with the synapse-associated protein SAP90/PSD-95*. *J Neurochem*, 2001. **78**(3): p. 482-9.
5. Burkhardt, C., M. Muller, A. Badde, C.C. Garner, E.D. Gundelfinger, and A.W. Puschel, *Semaphorin 4B interacts with the post-synaptic density protein PSD-95/SAP90 and is recruited to synapses through a C-terminal PDZ-binding motif*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(17): p. 3821-8.
6. Tamagnone, L. and P.M. Comoglio, *To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(4): p. 356-61.
7. Klostermann, A., M. Lohrum, R.H. Adams, and A.W. Puschel, *The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(13): p. 7326-31.
8. Love, C.A., K. Harlos, N. Mavaddat, S.J. Davis, D.I. Stuart, E.Y. Jones, and R.M. Esnouf, *The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(10): p. 843-8.
9. He, Z. and M. Tessier-Lavigne, *Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III*. *Cell*, 1997. **90**(4): p. 739-51.
10. Takagi, S., T. Hirata, K. Agata, M. Mochii, G. Eguchi, and H. Fujisawa, *The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors*. *Neuron*, 1991. **7**(2): p. 295-307.
11. Feiner, L., A.M. Koppel, H. Kobayashi, and J.A. Raper, *Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilin with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ*. *Neuron*, 1997. **19**(3): p. 539-45.
12. Xu, X., S. Ng, Z.L. Wu, D. Nguyen, S. Homburger, C. Seidel-Dugan, A. Ebens, and Y. Luo, *Human semaphorin K1 is glycosylphosphatidylinositol-linked and defines a new subfamily of viral-related semaphorins*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(35): p. 22428-34.
13. Takahashi, T., F. Nakamura, Z. Jin, R.G. Kalb, and S.M. Strittmatter, *Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors*. *Nat Neurosci*, 1998. **1**(6): p. 487-93.
14. Nakamura, F., M. Tanaka, T. Takahashi, R.G. Kalb, and S.M. Strittmatter, *Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse*. *Neuron*, 1998. **21**(5): p. 1093-100.
15. Comeau, M.R., R. Johnson, R.F. DuBose, M. Petersen, P. Gearing, T. VandenBos, L. Park, T. Farrah, R.M. Buller, J.I. Cohen, L.D. Strockbine, C. Rauch, and M.K. Spriggs, *A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR*. *Immunity*, 1998. **8**(4): p. 473-82.

16. Winberg, M.L., J.N. Noordermeer, L. Tamagnone, P.M. Comoglio, M.K. Spriggs, M. Tessier-Lavigne, and C.S. Goodman, *Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance*. Cell, 1998. **95**(7): p. 903-16.
17. Cai, H. and R.R. Reed, *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, 1999. **19**(15): p. 6519-27.
18. Castellani, V., A. Chedotal, M. Schachner, C. Faivre-Sarrailh, and G. Rougon, *Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance*. Neuron, 2000. **27**(2): p. 237-49.
19. Castellani, V., E. De Angelis, S. Kenwrick, and G. Rougon, *Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A*. EMBO J, 2002. **21**(23): p. 6348-57.
20. Kruger, R.P., J. Aurrandt, and K.L. Guan, *Semaphorins command cells to move*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 789-800.
21. Tamagnone, L. and P.M. Comoglio, *Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(9): p. 377-83.
22. Tamagnone, L., S. Artigiani, H. Chen, Z. He, G.I. Ming, H. Song, A. Chedotal, M.L. Winberg, C.S. Goodman, M. Poo, M. Tessier-Lavigne, and P.M. Comoglio, *Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates*. Cell, 1999. **99**(1): p. 71-80.
23. Bork, P., T. Doerks, T.A. Springer, and B. Snel, *Domains in plexins: links to integrins and transcription factors*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(7): p. 261-3.
24. Maestrini, E., L. Tamagnone, P. Longati, O. Cremona, M. Gulisano, S. Bione, F. Tamanini, B.G. Neel, D. Toniolo, and P.M. Comoglio, *A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 674-8.
25. Pasterkamp, R.J., J.J. Peschon, M.K. Spriggs, and A.L. Kolodkin, *Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 398-405.
26. Kumanogoh, A., C. Watanabe, I. Lee, X. Wang, W. Shi, H. Araki, H. Hirata, K. Iwahori, J. Uchida, T. Yasui, M. Matsumoto, K. Yoshida, H. Yakura, C. Pan, J.R. Parnes, and H. Kikutani, *Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 621-31.
27. Kumanogoh, A., S. Marukawa, K. Suzuki, N. Takegahara, C. Watanabe, E. Ch'ng, I. Ishida, H. Fujimura, S. Sakoda, K. Yoshida, and H. Kikutani, *Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 629-33.
28. Dickson, B.J., *Molecular mechanisms of axon guidance*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1959-64.
29. Tessier-Lavigne, M. and C.S. Goodman, *The molecular biology of axon guidance*. Science, 1996. **274**(5290): p. 1123-33.
30. Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz, *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
31. Kolodkin, A.L., D.J. Matthes, and C.S. Goodman, *The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1389-99.

32. Luo, Y., D. Raible, and J.A. Raper, *Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones*. Cell, 1993. **75**(2): p. 217-27.
33. Shepherd, I.T. and J.A. Raper, *Collapsin-1/semaphorin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons*. Dev Biol, 1999. **212**(1): p. 42-53.
34. Varela-Echavarría, A., A. Tucker, A.W. Puschel, and S. Guthrie, *Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D*. Neuron, 1997. **18**(2): p. 193-207.
35. Steup, A., M. Lohrum, N. Hamscho, N.E. Savaskan, O. Ninnemann, R. Nitsch, H. Fujisawa, A.W. Puschel, and T. Skutella, *Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation*. Mol Cell Neurosci, 2000. **15**(2): p. 141-55.
36. de Castro, F., L. Hu, H. Drabkin, C. Sotelo, and A. Chedotal, *Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins*. J Neurosci, 1999. **19**(11): p. 4428-36.
37. Koppel, A.M. and J.A. Raper, *Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15708-13.
38. Adams, R.H., M. Lohrum, A. Klostermann, H. Betz, and A.W. Puschel, *The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing*. EMBO J, 1997. **16**(20): p. 6077-86.
39. Kobayashi, H., A.M. Koppel, Y. Luo, and J.A. Raper, *A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance*. J Neurosci, 1997. **17**(21): p. 8339-52.
40. Bagnard, D., M. Lohrum, D. Uziel, A.W. Puschel, and J. Bolz, *Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections*. Development, 1998. **125**(24): p. 5043-53.
41. Polleux, F., T. Morrow, and A. Ghosh, *Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 567-73.
42. Nakamura, F., R.G. Kalb, and S.M. Strittmatter, *Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance*. J Neurobiol, 2000. **44**(2): p. 219-29.
43. Song, H., G. Ming, Z. He, M. Lehmann, L. McKerracher, M. Tessier-Lavigne, and M. Poo, *Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1515-8.
44. Eickholt, B.J., S.L. Mackenzie, A. Graham, F.S. Walsh, and P. Doherty, *Evidence for collapsin-1 functioning in the control of neural crest migration in both trunk and hindbrain regions*. Development, 1999. **126**(10): p. 2181-9.
45. Kawasaki, T., Y. Bekku, F. Suto, T. Kitsukawa, M. Taniguchi, I. Nagatsu, T. Nagatsu, K. Itoh, T. Yagi, and H. Fujisawa, *Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system*. Development, 2002. **129**(3): p. 671-80.
46. Marin, O., A. Yaron, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, and J.L. Rubenstein, *Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions*. Science, 2001. **293**(5531): p. 872-5.
47. Chen, G., J. Sima, M. Jin, K.Y. Wang, X.J. Xue, W. Zheng, Y.Q. Ding, and X.B. Yuan, *Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development*. Nat Neurosci, 2008. **11**(1): p. 36-44.
48. Xu, X.M., D.A. Fisher, L. Zhou, F.A. White, S. Ng, W.D. Snider, and Y. Luo, *The transmembrane protein semaphorin 6A repels embryonic sympathetic axons*. J Neurosci, 2000. **20**(7): p. 2638-48.

49. Kerjan, G., J. Dolan, C. Haumaitre, S. Schneider-Maunoury, H. Fujisawa, K.J. Mitchell, and A. Chedotal, *The transmembrane semaphorin Sema6A controls cerebellar granule cell migration*. Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1516-24.
50. Pasterkamp, R.J., R.J. Giger, M.J. Ruitenber, A.J. Holtmaat, J. De Wit, F. De Winter, and J. Verhaagen, *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, 1999. **13**(2): p. 143-66.
51. Pasterkamp, R.J., P.N. Anderson, and J. Verhaagen, *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, 2001. **13**(3): p. 457-71.
52. Moreau-Fauvarque, C., A. Kumanogoh, E. Camand, C. Jaillard, G. Barbin, I. Boquet, C. Love, E.Y. Jones, H. Kikutani, C. Lubetzki, I. Dusart, and A. Chedotal, *The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion*. J Neurosci, 2003. **23**(27): p. 9229-39.
53. Miao, H.Q., S. Soker, L. Feiner, J.L. Alonso, J.A. Raper, and M. Klagsbrun, *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, 1999. **146**(1): p. 233-42.
54. Serini, G., D. Valdembrì, S. Zanivan, G. Morterra, C. Burkhardt, F. Caccavari, L. Zammataro, L. Primo, L. Tamagnone, M. Logan, M. Tessier-Lavigne, M. Taniguchi, A.W. Puschel, and F. Bussolino, *Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 391-7.
55. Behar, O., J.A. Golden, H. Mashimo, F.J. Schoen, and M.C. Fishman, *Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart*. Nature, 1996. **383**(6600): p. 525-8.
56. Feiner, L., A.L. Webber, C.B. Brown, M.M. Lu, L. Jia, P. Feinstein, P. Mombaerts, J.A. Epstein, and J.A. Raper, *Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption*. Development, 2001. **128**(16): p. 3061-70.
57. Gitler, A.D., M.M. Lu, and J.A. Epstein, *PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development*. Dev Cell, 2004. **7**(1): p. 107-16.
58. Torres-Vazquez, J., A.D. Gitler, S.D. Fraser, J.D. Berk, N.P. Van, M.C. Fishman, S. Childs, J.A. Epstein, and B.M. Weinstein, *Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature*. Dev Cell, 2004. **7**(1): p. 117-23.
59. Gu, C., Y. Yoshida, J. Livet, D.V. Reimert, F. Mann, J. Merte, C.E. Henderson, T.M. Jessell, A.L. Kolodkin, and D.D. Ginty, *Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins*. Science, 2005. **307**(5707): p. 265-8.
60. Conrotto, P., D. Valdembrì, S. Corso, G. Serini, L. Tamagnone, P.M. Comoglio, F. Bussolino, and S. Giordano, *Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4321-9.
61. Moretti, S., A. Procopio, M. Boemi, and A. Catalano, *Neuronal semaphorins regulate a primary immune response*. Curr Neurovasc Res, 2006. **3**(4): p. 295-305.

62. Delaire, S., C. Billard, R. Tordjman, A. Chedotal, A. Elhabazi, A. Bensussan, and L. Boumsell, *Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration.* J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4348-54.
63. Vincent, P., Y. Collette, R. Marignier, C. Vuailleat, V. Rogemond, N. Davoust, C. Malcus, S. Cavagna, A. Gessain, I. Machuca-Gayet, M.F. Belin, T. Quach, and P. Giraudon, *A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration.* J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7650-60.
64. Hall, K.T., L. Boumsell, J.L. Schultze, V.A. Boussiotis, D.M. Dorfman, A.A. Cardoso, A. Bensussan, L.M. Nadler, and G.J. Freeman, *Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11780-5.
65. Ishida, I., A. Kumanogoh, K. Suzuki, S. Akahani, K. Noda, and H. Kikutani, *Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses.* Int Immunol, 2003. **15**(8): p. 1027-34.
66. Giraudon, P., P. Vincent, C. Vuailleat, O. Verlaeten, L. Cartier, A. Marie-Cardine, M. Mutin, A. Bensussan, M.F. Belin, and L. Boumsell, *Semaphorin CD100 from activated T lymphocytes induces process extension collapse in oligodendrocytes and death of immature neural cells.* J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1246-55.
67. Kumanogoh, A., K. Suzuki, E. Ch'ng, C. Watanabe, S. Marukawa, N. Takegahara, I. Ishida, T. Sato, S. Habu, K. Yoshida, W. Shi, and H. Kikutani, *Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells.* J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1175-81.
68. Suzuki, K., T. Okuno, M. Yamamoto, R.J. Pasterkamp, N. Takegahara, H. Takamatsu, T. Kitao, J. Takagi, P.D. Rennert, A.L. Kolodkin, A. Kumanogoh, and H. Kikutani, *Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin.* Nature, 2007. **446**(7136): p. 680-4.
69. Sekido, Y., S. Bader, F. Latif, J.Y. Chen, F.M. Duh, M.H. Wei, J.P. Albanesi, C.C. Lee, M.I. Lerman, and J.D. Minna, *Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4120-5.
70. Zabarovsky, E.R., M.I. Lerman, and J.D. Minna, *Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers.* Oncogene, 2002. **21**(45): p. 6915-35.
71. Tse, C., R.H. Xiang, T. Bracht, and S.L. Naylor, *Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line.* Cancer Res, 2002. **62**(2): p. 542-6.
72. Xiang, R., A.R. Davalos, C.H. Hensel, X.J. Zhou, C. Tse, and S.L. Naylor, *Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice.* Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2637-43.
73. Tomizawa, Y., Y. Sekido, M. Kondo, B. Gao, J. Yokota, J. Roche, H. Drabkin, M.I. Lerman, A.F. Gazdar, and J.D. Minna, *Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13954-9.
74. Castro-Rivera, E., S. Ran, P. Thorpe, and J.D. Minna, *Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11432-7.

75. Bielenberg, D.R., Y. Hida, A. Shimizu, A. Kaipainen, M. Kreuter, C.C. Kim, and M. Klagsbrun, *Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1260-71.
76. Basile, J.R., A. Barac, T. Zhu, K.L. Guan, and J.S. Gutkind, *Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5212-24.
77. Basile, J.R., R.M. Castilho, V.P. Williams, and J.S. Gutkind, *Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9017-22.
78. Birchmeier, C., W. Birchmeier, E. Gherardi, and G.F. Vande Woude, *Met, metastasis, motility and more*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 915-25.
79. Trusolino, L. and P.M. Comoglio, *Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 289-300.
80. Giordano, S., S. Corso, P. Conrotto, S. Artigiani, G. Gilestro, D. Barberis, L. Tamagnone, and P.M. Comoglio, *The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 720-4.
81. Wong, O.G., T. Nitkunan, I. Oinuma, C. Zhou, V. Blanc, R.S. Brown, S.R. Bott, J. Nariculam, G. Box, P. Munson, J. Constantinou, M.R. Feneley, H. Klocker, S.A. Eccles, M. Negishi, A. Freeman, J.R. Masters, and M. Williamson, *Plexin-B1 mutations in prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 19040-5.
82. Bougeret, C., I.G. Mansur, H. Dastot, M. Schmid, G. Mahouy, A. Bensussan, and L. Boumsell, *Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation*. J Immunol, 1992. **148**(2): p. 318-23.
83. Delaire, S., A. Elhabazi, A. Bensussan, and L. Boumsell, *CD100 is a leukocyte semaphorin*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(11): p. 1265-76.
84. Furuyama, T., S. Inagaki, A. Kosugi, S. Noda, S. Saitoh, M. Ogata, Y. Iwahashi, N. Miyazaki, T. Hamaoka, and M. Tohyama, *Identification of a novel transmembrane semaphorin expressed on lymphocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33376-81.
85. Kumanogoh, A. and H. Kikutani, *Biological functions and signaling of a transmembrane semaphorin, CD100/Sema4D*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(3): p. 292-300.
86. Kumanogoh, A. and H. Kikutani, *The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation*. Trends Immunol, 2001. **22**(12): p. 670-6.
87. Wang, X., A. Kumanogoh, C. Watanabe, W. Shi, K. Yoshida, and H. Kikutani, *Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3498-504.
88. Watanabe, C., A. Kumanogoh, W. Shi, K. Suzuki, S. Yamada, M. Okabe, K. Yoshida, and H. Kikutani, *Enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of the lymphocyte semaphorin CD100*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4321-8.
89. Elhabazi, A., S. Delaire, A. Bensussan, L. Boumsell, and G. Bismuth, *Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4341-7.

90. Herold, C., A. Elhabazi, G. Bismuth, A. Bensussan, and L. Boumsell, *CD100 is associated with CD45 at the surface of human T lymphocytes. Role in T cell homotypic adhesion.* J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5262-8.
91. Herold, C., G. Bismuth, A. Bensussan, and L. Boumsell, *Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb.* Int Immunol, 1995. **7**(1): p. 1-8.
92. Billard, C., S. Delaire, E. Raffoux, A. Bensussan, and L. Boumsell, *Switch in the protein tyrosine phosphatase associated with human CD100 semaphorin at terminal B-cell differentiation stage.* Blood, 2000. **95**(3): p. 965-72.
93. Elhabazi, A., V. Lang, C. Herold, G.J. Freeman, A. Bensussan, L. Boumsell, and G. Bismuth, *The human semaphorin-like leukocyte cell surface molecule CD100 associates with a serine kinase activity.* J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23515-20.
94. Worzfeld, T., A.W. Puschel, S. Offermanns, and R. Kuner, *Plexin-B family members demonstrate non-redundant expression patterns in the developing mouse nervous system: an anatomical basis for morphogenetic effects of Sema4D during development.* Eur J Neurosci, 2004. **19**(10): p. 2622-32.
95. Conrotto, P., S. Corso, S. Gamberini, P.M. Comoglio, and S. Giordano, *Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth.* Oncogene, 2004. **23**(30): p. 5131-7.
96. Swiercz, J.M., R. Kuner, and S. Offermanns, *Plexin-B1/RhoGEF-mediated RhoA activation involves the receptor tyrosine kinase ErbB-2.* J Cell Biol, 2004. **165**(6): p. 869-80.
97. Swiercz, J.M., T. Worzfeld, and S. Offermanns, *ERBB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1.* J Biol Chem, 2007.
98. Usui, H., M. Taniguchi, T. Yokomizo, and T. Shimizu, *Plexin-A1 and plexin-B1 specifically interact at their cytoplasmic domains.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(4): p. 927-31.
99. Oinuma, I., H. Katoh, A. Harada, and M. Negishi, *Direct interaction of Rnd1 with Plexin-B1 regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho activation by Plexin-B1 and induces cell contraction in COS-7 cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25671-7.
100. Swiercz, J.M., R. Kuner, J. Behrens, and S. Offermanns, *Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology.* Neuron, 2002. **35**(1): p. 51-63.
101. Aurandt, J., H.G. Vikis, J.S. Gutkind, N. Ahn, and K.L. Guan, *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, 2002. **99**(19): p. 12085-90.
102. Hirotsu, M., Y. Ohoka, T. Yamamoto, H. Nirasawa, T. Furuyama, M. Kogo, T. Matsuya, and S. Inagaki, *Interaction of plexin-B1 with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(1): p. 32-7.
103. Perrot, V., J. Vazquez-Prado, and J.S. Gutkind, *Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF.* J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43115-20.
104. Barberis, D., A. Casazza, R. Sordella, S. Corso, S. Artigiani, J. Settleman, P.M. Comoglio, and L. Tamagnone, *p190 Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphorin signalling.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4689-700.

105. Oinuma, I., Y. Ishikawa, H. Katoh, and M. Negishi, *The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras*. Science, 2004. **305**(5685): p. 862-5.
106. Oinuma, I., H. Katoh, and M. Negishi, *Molecular dissection of the semaphorin 4D receptor plexin-B1-stimulated R-Ras GTPase-activating protein activity and neurite remodeling in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2004. **24**(50): p. 11473-80.
107. Kinbara, K., L.E. Goldfinger, M. Hansen, F.L. Chou, and M.H. Ginsberg, *Ras GTPases: integrins' friends or foes?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 767-76.
108. Negishi, M., I. Oinuma, and H. Katoh, *Plexins: axon guidance and signal transduction*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(12): p. 1363-71.
109. Vikis, H.G., W. Li, Z. He, and K.L. Guan, *The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12457-62.
110. Vikis, H.G., W. Li, and K.L. Guan, *The plexin-B1/Rac interaction inhibits PAK activation and enhances Sema4D ligand binding*. Genes Dev, 2002. **16**(7): p. 836-45.
111. Forster, E., S. Zhao, and M. Frotscher, *Laminating the hippocampus*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(4): p. 259-67.
112. Govek, E.E., S.E. Newey, and L. Van Aelst, *The role of the Rho GTPases in neuronal development*. Genes Dev, 2005. **19**(1): p. 1-49.
113. Schwamborn, J.C. and A.W. Puschel, *The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity*. Nat Neurosci, 2004. **7**(9): p. 923-9.
114. Da Silva, J.S., M. Medina, C. Zuliani, A. Di Nardo, W. Witke, and C.G. Dotti, *RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability*. J Cell Biol, 2003. **162**(7): p. 1267-79.
115. Jin, Z. and S.M. Strittmatter, *Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse*. J Neurosci, 1997. **17**(16): p. 6256-63.
116. Sarner, S., R. Kozma, S. Ahmed, and L. Lim, *Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 158-72.
117. Fournier, A.E., B.T. Takizawa, and S.M. Strittmatter, *Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS*. J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1416-23.
118. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker, *The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture*. J Neurosci, 1988. **8**(4): p. 1454-68.
119. Higgins, D., M. Burack, P. Lein, and G. Banker, *Mechanisms of neuronal polarity*. Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(5): p. 599-604.
120. da Silva, J.S. and C.G. Dotti, *Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(9): p. 694-704.
121. Arimura, N., C. Menager, Y. Fukata, and K. Kaibuchi, *Role of CRMP-2 in neuronal polarity*. J Neurobiol, 2004. **58**(1): p. 34-47.
122. Inagaki, N., K. Chihara, N. Arimura, C. Menager, Y. Kawano, N. Matsuo, T. Nishimura, M. Amano, and K. Kaibuchi, *CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons*. Nat Neurosci, 2001. **4**(8): p. 781-2.

123. Arimura, N., N. Inagaki, K. Chihara, C. Menager, N. Nakamura, M. Amano, A. Iwamatsu, Y. Goshima, and K. Kaibuchi, *Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse.* J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23973-80.
124. Hall, C., M. Brown, T. Jacobs, G. Ferrari, N. Cann, M. Teo, C. Monfries, and L. Lim, *Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase.* J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43482-6.
125. Yoshimura, T., Y. Kawano, N. Arimura, S. Kawabata, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi, *GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity.* Cell, 2005. **120**(1): p. 137-49.
126. Threadgill, R., K. Bobb, and A. Ghosh, *Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42.* Neuron, 1997. **19**(3): p. 625-34.
127. Brouns, M.R., S.F. Matheson, and J. Settleman, *p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 361-7.
128. Billuart, P., C.G. Winter, A. Maresh, X. Zhao, and L. Luo, *Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway.* Cell, 2001. **107**(2): p. 195-207.
129. Ahnert-Hilger, G., M. Holtje, G. Grosse, G. Pickert, C. Mucke, B. Nixdorf-Bergweiler, P. Boquet, F. Hofmann, and I. Just, *Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones.* J Neurochem, 2004. **90**(1): p. 9-18.
130. Arakawa, Y., H. Bito, T. Furuyashiki, T. Tsuji, S. Takemoto-Kimura, K. Kimura, K. Nozaki, N. Hashimoto, and S. Narumiya, *Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons.* J Cell Biol, 2003. **161**(2): p. 381-91.
131. Chalasani, S.H., K.A. Sabelko, M.J. Sunshine, D.R. Littman, and J.A. Raper, *A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding.* J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1360-71.
132. Ben-Zvi, A., L. Ben-Gigi, Z. Yagil, O. Lerman, and O. Behar, *Semaphorin3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling.* Cell Signal, 2007.
133. Dent, E.W., A.M. Barnes, F. Tang, and K. Kalil, *Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton.* J Neurosci, 2004. **24**(12): p. 3002-12.
134. Cline, H.T., *Dendritic arbor development and synaptogenesis.* Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(1): p. 118-26.
135. Van Aelst, L. and H.T. Cline, *Rho GTPases and activity-dependent dendrite development.* Curr Opin Neurobiol, 2004. **14**(3): p. 297-304.
136. McAllister, A.K., *Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth.* Cereb Cortex, 2000. **10**(10): p. 963-73.
137. Wong, R.O. and A. Ghosh, *Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning.* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(10): p. 803-12.
138. Jan, Y.N. and L.Y. Jan, *The control of dendrite development.* Neuron, 2003. **40**(2): p. 229-42.
139. Nakayama, A.Y., M.B. Harms, and L. Luo, *Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons.* J Neurosci, 2000. **20**(14): p. 5329-38.

140. Pilpel, Y. and M. Segal, *Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(12): p. 3151-64.
141. Hayashi, K., T. Ohshima, and K. Mikoshiba, *Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons*. Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(4): p. 579-94.
142. Li, Z., L. Van Aelst, and H.T. Cline, *Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in Xenopus central neurons in vivo*. Nat Neurosci, 2000. **3**(3): p. 217-25.
143. Gutierrez, H., X. Dolcet, M. Tolcos, and A. Davies, *HGF regulates the development of cortical pyramidal dendrites*. Development, 2004. **131**(15): p. 3717-26.
144. Jung, W., E. Castren, M. Odenthal, G.F. Vande Woude, T. Ishii, H.P. Dienes, D. Lindholm, and P. Schirmacher, *Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain*. J Cell Biol, 1994. **126**(2): p. 485-94.
145. Korhonen, L., U. Sjöholm, N. Takei, M.A. Kern, P. Schirmacher, E. Castren, and D. Lindholm, *Expression of c-Met in developing rat hippocampus: evidence for HGF as a neurotrophic factor for calbindin D-expressing neurons*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(10): p. 3453-61.
146. Kumar, V., M.X. Zhang, M.W. Swank, J. Kunz, and G.Y. Wu, *Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways*. J Neurosci, 2005. **25**(49): p. 11288-99.
147. Jaworski, J., S. Spangler, D.P. Seeburg, C.C. Hoogenraad, and M. Sheng, *Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway*. J Neurosci, 2005. **25**(49): p. 11300-12.
148. Dijkhuizen, P.A. and A. Ghosh, *BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways*. J Neurobiol, 2005. **62**(2): p. 278-88.
149. Craig, A.M., C.D. Blackstone, R.L. Huganir, and G. Banker, *The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits*. Neuron, 1993. **10**(6): p. 1055-68.
150. Verderio, C., S. Coco, G. Fumagalli, and M. Matteoli, *Spatial changes in calcium signaling during the establishment of neuronal polarity and synaptogenesis*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1527-36.
151. Coco, S., C. Verderio, D. Trotti, J.D. Rothstein, A. Volterra, and M. Matteoli, *Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(9): p. 1902-10.
152. Fletcher, T.L., P. Cameron, P. De Camilli, and G. Banker, *The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture*. J Neurosci, 1991. **11**(6): p. 1617-26.
153. Matteoli, M., K. Takei, M.S. Perin, T.C. Sudhof, and P. De Camilli, *Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons*. J Cell Biol, 1992. **117**(4): p. 849-61.
154. Harris, K.M., *Structure, development, and plasticity of dendritic spines*. Curr Opin Neurobiol, 1999. **9**(3): p. 343-8.
155. Hering, H. and M. Sheng, *Dendritic spines: structure, dynamics and regulation*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(12): p. 880-8.
156. Ishikawa, Y., H. Katoh, and M. Negishi, *A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2003. **23**(35): p. 11065-72.

157. Morita, A., N. Yamashita, Y. Sasaki, Y. Uchida, O. Nakajima, F. Nakamura, T. Yagi, M. Taniguchi, H. Usui, R. Katoh-Semba, K. Takei, and Y. Goshima, *Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling*. J Neurosci, 2006. **26**(11): p. 2971-80.
158. Yamashita, N., A. Morita, Y. Uchida, F. Nakamura, H. Usui, T. Ohshima, M. Taniguchi, J. Honnorat, N. Thomasset, K. Takei, T. Takahashi, P. Kolattukudy, and Y. Goshima, *Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1*. J Neurosci, 2007. **27**(46): p. 12546-54.
159. Lin, X., M. Ogiya, M. Takahara, W. Yamaguchi, T. Furuyama, H. Tanaka, M. Tohyama, and S. Inagaki, *Sema4D-plexin-B1 implicated in regulation of dendritic spine density through RhoA/ROCK pathway*. Neurosci Lett, 2007. **428**(1): p. 1-6.
160. Fiore, R. and A.W. Puschel, *The function of semaphorins during nervous system development*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s484-99.
161. Liu, B.P. and S.M. Strittmatter, *Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 619-26.
162. Brennan, C. and J. Fabes, *Alkaline phosphatase fusion proteins as affinity probes for protein localization studies*. Sci STKE, 2003. **2003**(168): p. PL2.
163. Berger, J., J. Hauber, R. Hauber, R. Geiger, and B.R. Cullen, *Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells*. Gene, 1988. **66**(1): p. 1-10.
164. Sholl, D.A., *Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat*. J Anat, 1953. **87**(4): p. 387-406.
165. Francon, J., A.M. Lennon, A. Fellous, A. Mareck, M. Pierre, and J. Nunez, *Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development*. Eur J Biochem, 1982. **129**(2): p. 465-71.
166. Binder, L.I., A. Frankfurter, and L.I. Rebhun, *Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **466**: p. 145-66.
167. Kalil, K., G. Szebenyi, and E.W. Dent, *Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching*. J Neurobiol, 2000. **44**(2): p. 145-58.
168. Morotti, A., S. Mila, P. Accornero, E. Tagliabue, and C. Ponzetto, *K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor*. Oncogene, 2002. **21**(32): p. 4885-93.
169. Berg, M.M., D.W. Sternberg, L.F. Parada, and M.V. Chao, *K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 13-6.
170. Ishizaki, T., M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, M. Maekawa, and S. Narumiya, *Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(5): p. 976-83.
171. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
172. Naska, S., K.J. Park, G.E. Hannigan, S. Dedhar, F.D. Miller, and D.R. Kaplan, *An essential role for the integrin-linked kinase-glycogen synthase kinase-3 beta pathway during dendrite initiation and growth*. J Neurosci, 2006. **26**(51): p. 13344-56.
173. Yoshimura, T., N. Arimura, and K. Kaibuchi, *Molecular mechanisms of axon specification and neuronal disorders*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1086**: p. 116-25.

174. Yoshimura, T., N. Arimura, Y. Kawano, S. Kawabata, S. Wang, and K. Kaibuchi, *Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(1): p. 62-8.
175. Ito, Y., I. Oinuma, H. Katoh, K. Kaibuchi, and M. Negishi, *Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3beta through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(7): p. 704-9.
176. Takahashi, M., K. Yasutake, and K. Tomizawa, *Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta-dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons*. *J Neurochem*, 1999. **73**(5): p. 2073-83.
177. Tanizawa, Y., A. Kuhara, H. Inada, E. Kodama, T. Mizuno, and I. Mori, *Inositol monophosphatase regulates localization of synaptic components and behavior in the mature nervous system of C. elegans*. *Genes Dev*, 2006. **20**(23): p. 3296-310.
178. Masuda, K., T. Furuyama, M. Takahara, S. Fujioka, H. Kurinami, and S. Inagaki, *Sema4D stimulates axonal outgrowth of embryonic DRG sensory neurones*. *Genes Cells*, 2004. **9**(9): p. 821-9.
179. Mullen, R.J., C.R. Buck, and A.M. Smith, *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates*. *Development*, 1992. **116**(1): p. 201-11.
180. Roelofs, R.F., D.F. Fischer, S.H. Houtman, J.A. Sluijs, W. Van Haren, F.W. Van Leeuwen, and E.M. Hol, *Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton*. *Glia*, 2005. **52**(4): p. 289-300.
181. Liu, S., J. Wang, D. Zhu, Y. Fu, K. Lukowiak, and Y.M. Lu, *Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus*. *J Neurosci*, 2003. **23**(3): p. 732-6.
182. Liu, X.B., L.K. Low, E.G. Jones, and H.J. Cheng, *Stereotyped axon pruning via plexin signaling is associated with synaptic complex elimination in the hippocampus*. *J Neurosci*, 2005. **25**(40): p. 9124-34.
183. Deng, S., A. Hirschberg, T. Worzfeld, J.Y. Penachioni, A. Korostylev, J.M. Swiercz, P. Vodrazka, O. Mauti, E.T. Stoeckli, L. Tamagnone, S. Offermanns, and R. Kuner, *Plexin-B2, but not Plexin-B1, critically modulates neuronal migration and patterning of the developing nervous system in vivo*. *J Neurosci*, 2007. **27**(23): p. 6333-47.
184. Friedel, R.H., G. Kerjan, H. Rayburn, U. Schuller, C. Sotelo, M. Tessier-Lavigne, and A. Chedotal, *Plexin-B2 controls the development of cerebellar granule cells*. *J Neurosci*, 2007. **27**(14): p. 3921-32.
185. Verderio, C., S. Coco, E. Pravettoni, A. Bacci, and M. Matteoli, *Synaptogenesis in hippocampal cultures*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(11): p. 1448-62.
186. Wiedenmann, B. and W.W. Franke, *Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles*. *Cell*, 1985. **41**(3): p. 1017-28.
187. Raper, J.A., *Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates*. *Curr Opin Neurobiol*, 2000. **10**(1): p. 88-94.
188. Campbell, D.S., A.G. Regan, J.S. Lopez, D. Tannahill, W.A. Harris, and C.E. Holt, *Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning, and branching in Xenopus retinal growth cones*. *J Neurosci*, 2001. **21**(21): p. 8538-47.
189. Tang, F. and K. Kalil, *Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways*. *J Neurosci*, 2005. **25**(28): p. 6702-15.

190. Luo, L., *Rho GTPases in neuronal morphogenesis*. Nat Rev Neurosci, 2000. **1**(3): p. 173-80.
191. Tyndall, S.J., S.J. Patel, and R.S. Walikonis, *Hepatocyte growth factor-induced enhancement of dendritic branching is blocked by inhibitors of N-methyl-D-aspartate receptors and calcium/calmodulin-dependent kinases*. J Neurosci Res, 2007. **85**(11): p. 2343-51.
192. Jones, D.M., B.A. Tucker, M. Rahimtula, and K.M. Mearow, *The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway*. J Neurochem, 2003. **86**(5): p. 1116-28.
193. Basile, J.R., T. Afkhami, and J.S. Gutkind, *Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6889-98.
194. Basile, J.R., J. Gavard, and J.S. Gutkind, *Plexin-B1 utilizes RhoA and Rho kinase to promote the integrin-dependent activation of Akt and ERK and endothelial cell motility*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34888-95.
195. Brandt, N., K. Franke, M.R. Rasin, J. Baumgart, J. Vogt, S. Khrulev, B. Hassel, E.E. Pohl, N. Sestan, R. Nitsch, and S. Schumacher, *The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity*. EMBO J, 2007. **26**(9): p. 2371-86.
196. Jossin, Y. and A.M. Goffinet, *Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(20): p. 7113-24.
197. Takei, N., N. Inamura, M. Kawamura, H. Namba, K. Hara, K. Yonezawa, and H. Nawa, *Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites*. J Neurosci, 2004. **24**(44): p. 9760-9.
198. Jaworski, J. and M. Sheng, *The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity*. Mol Neurobiol, 2006. **34**(3): p. 205-19.
199. Asaki, C., N. Usuda, A. Nakazawa, K. Kametani, and T. Suzuki, *Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain*. Brain Res, 2003. **972**(1-2): p. 168-76.
200. Dailey, M.E. and S.J. Smith, *The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices*. J Neurosci, 1996. **16**(9): p. 2983-94.
201. Jontes, J.D. and S.J. Smith, *Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity*. Neuron, 2000. **27**(1): p. 11-4.
202. Hall, A., *Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 31-54.
203. Tashiro, A., A. Minden, and R. Yuste, *Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho*. Cereb Cortex, 2000. **10**(10): p. 927-38.
204. Paradis, S., D.B. Harrar, Y. Lin, A.C. Koon, J.L. Hauser, E.C. Griffith, L. Zhu, L.F. Brass, C. Chen, and M.E. Greenberg, *An RNAi-based approach identifies molecules required for glutamatergic and GABAergic synapse development*. Neuron, 2007. **53**(2): p. 217-32.

Veröffentlichungen und Poster

Veröffentlichungen:

- 1 Zuliani, C., S. Kleber, S. Klussmann, T. Wenger, M. Kenzelmann, N. Schreglmann, A. Martinez, J.A. del Rio, E. Soriano, P. Vodrazka, R. Kuner, H.J. Groene, I. Herr, P.H. Krammer, and A. Martin-Villalba, *Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1)*. Cell Death Differ, 2006. **13**(1): p. 31-40.
- 2 Deng, S., A. Hirschberg, T. Worzfeld, J.Y. Penachioni, A. Korostylev, J.M. Swiercz, P. Vodrazka, O. Mauti, E.T. Stoeckli, L. Tamagnone, S. Offermanns, and R. Kuner, *Plexin-B2, but not Plexin-B1, critically modulates neuronal migration and patterning of the developing nervous system in vivo*. J Neurosci, 2007. **27**(23): p. 6333-47

In Vorbereitung:

- 3 Vodrazka, P., A. Korostylev, J. Swiercz, T. Worzfeld, S. Deng, P.Fazzari, A. Hirschberg, L. Tamagnone, S. Offermanns and R. Kuner, *The Sema4D-Plexin-B signaling complex regulates dendritic complexity in developing neurons via diverse pathways*.
- 4 Korostylev A., T. Worzfeld, S. Deng, R. Friedel, J.Swiercz, P. Vodrazka, V. Maier, A. Hirschberg, Y. Ohoka, S.Inagaki, S. Offermanns, R. Kuner. *A functional role for Semaphorin 4D-Plexin-B1 interactions in epithelial branching morphogenesis during organogenesis*.

Posterpräsentation:

- 1 Vodrazka P. , A. Korostylev , J. Swiercz , T. Worzfeld , S. Deng , A. Hirschberg , S. Inagaki , L. Tamagnone , S. Offermanns , R. Kuner. *The Sema4D-Plexin-B signaling complex regulates dendritic and axonal arborisation in developing neurons*. Society for Neuroscience Meeting, San Diego, USA, 2007

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Rohini Kuner bedanken, die mir die Gelegenheit gab in Ihrem internationalen und hervorragend ausgestatteten Labor am Pharmakologischen Institut meine Doktorarbeit anzufertigen. Von Ihr erhielt ich Unterstützung in vollem Umfang bei wissenschaftlichen Fragestellungen, der Etablierung neuer Methoden und Kooperationen, meiner persönlichen Weiterbildung, Kongressbesuchen und der Anfertigungen und dem Abschluss meiner Doktorarbeit. Danke, Rohini!

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Offermanns für die Diskussionen und Anregungen zu meiner Arbeit in den Montagsseminaren und bei Prof. Dr. Wieland, der sich bereit erklärte als mein Erstgutachter zu fungieren.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern der Plexingruppe der ersten Stunde: Thomas Worzfeld, Alexander Korostylev, Jakub Swiercz, Suhua Deng und Alexandra Hirschberg, die mir bei meinem Projekt mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke allen Kollegen der AG Kuner für eine sehr offene und angenehme Laboratmosphäre, die mir ermöglichte verschiedenste Kulturen persönlich und kulinarisch kennen zu lernen. Den Kollegen der übrigen Arbeitsgruppen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, den Erfahrungsaustausch auf den Seminaren und den sportlichen Ertüchtigungen auf der Neckarwiese.

Bei Christian Maurer, Matthias Schweizerhof, Dr. Andreas Gille und Dr. Dominique Brand bedanke ich mich für eine gute Zeit und bei Hans-Josef Wrede für sein freundliches Wesen, die Mithilfe bei meinen Versuchen und seine vielen konstruktiven Ratschläge.

Ich danke meiner Familie, insbesondere Dana und Paul für ihre liebevolle Unterstützung, jeder auf seine Art.