

Matthias Zielonka

Dr. med.

## **Expressions- und Signaltransduktionsanalyse der B-Plexine unter Verwendung eines RNA - Interferenz Hochdurchsatzverfahrens**

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Offermanns

Die Proteinfamilie der Plexine konstituiert eine Gruppe von Transmembranrezeptoren, welche die Effekte von Semaphorinen vermitteln. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Subgruppe der Plexine, den Plexinen der B-Familie.

Für das Verständnis der Funktion der B-Plexine ist die detaillierte Kenntnis ihrer Expression eine grundlegende Voraussetzung. Aus diesem Grund wurde eine umfassende und systematische Expressionsanalyse der B-Plexine sowie von deren Liganden Semaphorin 4C und Semaphorin 4D unter Verwendung zweier unabhängiger Methoden in nicht-neuronalen Geweben der adulten Maus durchgeführt und die Expressionsmuster im Hinblick auf eine funktionelle Redundanz der Liganden-Rezeptorpaare systematisch miteinander verglichen. Plexin-B2 sowie dessen hoch-affiner Ligand Semaphorin 4C sind außerhalb des Nervensystems im adulten Organismus weithin exprimiert und lokalisieren in diskreten Zelltypen. Im Gefäßsystem ist Plexin-B2 in spezialisierten Endothelzellen der Lebersinusoide sowie im Endothel hochendothelialer Venolen selektiv exprimiert. In endokrinen Organen findet sich Plexin-B2 in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas sowohl in  $\alpha$ - als auch in  $\beta$ -Zellen und wird in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sowie der Zona glomerulosa und fasciculata der Nebennierenrinde ebenfalls hoch exprimiert. Darüber hinaus konnte eine Plexin-B2-Expression im Epithel zahlreicher Organsysteme (Niere, Darm, Lunge) nachgewiesen werden. Plexin-B2 sowie dessen Ligand Semaphorin 4C zeigen in vielen, jedoch nicht allen Geweben, ein komplementäres oder überlappendes Expressionsmuster. Redundante Expressionsmuster der Plexin-Isoformen im adulten Organismus finden sich hingegen lediglich in den Nierenglomeruli, dem adrenalen Cortex sowie dem Bronchialepithel.

Basierend auf der weitreichenden Expression der B-Plexine wurden die Mechanismen der B-Plexin-vermittelten Aktivierung der kleinen GTPase RhoA, die einen Großteil der Funktionen dieser Transmembranrezeptoren vermittelt, analysiert. Hierzu wurde ein zellbasiertes RNA-Interferenz Hochdurchsatzverfahren generiert, das es erlaubt innerhalb kürzester Zeit die

funktionelle Relevanz zahlreicher Proteinfamilien zu untersuchen. In einem ersten Schritt wurde ein retrovirales, für Firefly Luciferase-kodierendes Reporterplasmid kloniert, dieses mittels retroviraler Transduktion stabil in die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eingebracht und die Funktionalität der Reporterzelllinie nach Stimulation mit den Liganden LPA und Semaphorin 4D lumineszenzphotometrisch bestätigt. Nach Etablierung eines standardisierten Versuchsprotokolls wurde unter Verwendung einer gegen das humane Kinom gerichteten siRNA-Bibliothek die potenzielle Rolle humaner Kinasen in der B-Plexin-vermittelten RhoA-Aktivierung untersucht. Im durchgeführten RNA-Interferenz Hochdurchsatzverfahren wurden insgesamt 22, für die Signaltransduktion der B-Plexine funktionell relevante, Kinasen identifiziert, unter denen sich die drei Untereinheiten des heterotrimären IKK-Komplexes fanden. Das im Rahmen dieser Arbeit generierte RNA-Interferenz Hochdurchsatzverfahren wird zukünftig die Untersuchung zahlreicher Proteinfamilien in der Signaltransduktion der B-Plexine sowie in der Aktivierung der kleinen GTPase RhoA unter reliablen Bedingungen zeiteffizient ermöglichen. Die Rolle des IKK-Komplexes in der Signaltransduktion der B-Plexine wurde anschließend genauer analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der IKK-Komplex NF- $\kappa$ B-unabhängig für die trans-Phosphorylierung der assoziierten Rezeptortyrosinkinase ErbB-2, und damit einem der ersten Schritte in der Signaltransduktion der B-Plexine notwendig ist. Für diese Funktion sind die Kinasedomänen der beiden katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  von zentraler Bedeutung. Darüber hinaus wird die Aktivität des heterotrimären IKK-Komplexes für die extrazelluläre Assoziation von Plexin-B1 und ErbB-2 benötigt, die nicht direkt erfolgt, sondern durch einen noch unbekanntem, intermediären Interaktionspartner vermittelt wird. Dieser fungiert höchstwahrscheinlich als Substrat der IKK-induzierten Phosphorylierung. Die GAP-Funktion der B-Plexine ist IKK-unabhängig. Die B-Plexin-vermittelte Aktivierung von RhoA lässt sich zudem durch TNF $\alpha$  bahnen. Die Interaktion in der Signaltransduktion der B-Plexine stellt eine weitere NF- $\kappa$ B-unabhängige Funktion des IKK-Komplexes dar, der Inflammation und Entzündung mit der Progression von Tumoren ein weiteres Mal mechanistisch verbinden könnte.