

ZUSAMMENFASSUNG

Netrin-1 ist ein extrazelluläres, neuronales Wegfindungsmolekül und nimmt einen essentiellen Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems in Invertebraten und Vertebraten. Es besitzt in Abhängigkeit der in den jeweiligen Geweben vorkommenden Zelloberflächenrezeptoren, eine anziehende- bzw. abstoßende Wirkung auf wachsende Axone. Seine Funktion verdeutlichen Netrin-1 defiziente Mäuse, die erhebliche neuronale Defekte aufweisen und kurz nach der Geburt sterben. Darüber hinaus wird Netrin-1 in nicht-neuronalen Geweben exprimiert und beeinflusst Adhäsions- und Migrationsprozesse während der Organmorphogenese. Auch apoptotische Prozesse werden von Netrin-1 und seinen Rezeptoren reguliert. In Abwesenheit von Netrin-1 werden über die sogenannten *dependence receptors* DCC und Unc5 Caspasen aktiviert, die einen programmierten Zelltod induzieren. Diesen Effekt machen sich manche Tumorzellen zunutze, die Netrin-1 in hohen Mengen sekretieren, und somit ihr eigenes Zellüberleben unterstützen. Die molekularen Prozesse sind in vielen Fällen noch völlig unklar und scheinen komplexer zu sein als bisher angenommen.

In dieser Arbeit wurden zunächst die Domänen bzw. die genauen Aminosäuren ermittelt über die Netrin-1 an seine bekannten Rezeptoren bindet. Hierzu dienten ELISA-artige Bindungsversuche und SPR-Analysen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Bindeepitope in der Netrin-1 V-2 Domäne identifiziert. Die Aminosäuren MELYKLS binden die Rezeptoren der DCC-Familie darunter Neogenin, während zwei aufeinander folgende Arginin-Reste für die Bindung an die Mitglieder der Unc5-Rezeptorfamilie (H1-H4) verantwortlich sind. Außerdem wurden die Bindedomänen in den entsprechenden Rezeptoren ermittelt. Mit Hilfe molekular- und strukturbiochemischer Methoden konnte ein neues Modell eines Netrin-1, Neogenin, Unc5 Ligand-Rezeptor-Komplexes erstellt werden. Darüber hinaus wurde in Zusammenarbeit mit Jörg Stetefeld (Universität zu Manitoba, Kanada) die Kristallstruktur von Netrin-1 gelöst, die weitere strukturelle Erkenntnisse über das Protein lieferte. Mit jenen Informationen konnte ein räumliches Modell eines Ligand-Rezeptor-Komplexes zwischen Netrin-1 und Neogenin mittels SAXS dargestellt werden. Für die anschließende funktionelle Analyse der Ligand-Rezeptor-Interaktion wurden die identifizierten Netrin-1 Rezeptorbindemutanten genutzt. Dabei lag der Fokus auf Adhäsion-, Apoptose- und Signalweiterleitungs-Prozessen sowie der neuronalen Auswachsung und Verzweigung. Darüber hinaus wurden Glypican, Testican, Laminin, Slit-2 und NDNF als neue extrazelluläre

Liganden für Netrin-1 mittels Kopräzipitation identifiziert und ihre Bindung an Netrin-1 über Protein-Protein-Interaktionsstudien bestätigt.

ABSTRACT

Netrin-1 is a laminin related protein that resembles the most investigated member of the netrin family. First it was discovered as a neuronal guidance molecule in the developing central nervous system. Netrin-1 deficient mice are perinatal lethal due to dramatic neuronal defects highlighting the importance of the molecule in neuronal development. It is described that netrin-1 promotes chemoattraction as well as chemorepulsion in growing axons upon binding to its dependence receptors DCC/Neogenin and Unc5, respectively. Moreover netrin-1 is an essential mediator of vertebrate development outside the nervous system with influences on cell adhesion and migration as well as regulation of cell survival. According to the dependence receptor hypothesis, DCC and Unc5 can induce apoptosis in the absence of its ligand netrin-1. Some cancer cells take advantage of this effect and secrete high amounts of netrin-1 to escape cell death. The molecular processes of netrin-1 and its receptor interactions are still unknown and seem to be more complex as predicted.

A first goal of this work was to determine the domains as well as the precise amino acid sequence of netrin-1 which contribute to receptor binding. Two distinct binding-epitopes in netrin-1 V-2 domain were identified via ELISA-style binding assays as well as SPR-analysis. While the amino acids MELYKLS bind to the receptors of the DCC-family along with neogenin, two arginin-residues are involved in Unc5-receptorfamily (H1-H4) binding. In addition, the binding domains of the netrin-1 receptors were identified and their molecular and structural analysis strongly suggested a new netrin-1, neogenin, unc5 ligand-receptor model. Furthermore the crystal structure of netrin-1 was solved in cooperation with Prof. Dr. Jörg Stetefeld (University of Manitoba, Canada). Thus, combining the molecular and structural knowledge it was then possible to generate a three-dimensional Model of netrin-1 and neogenin via SAXS-analysis. To further define the functional relevance of ligand-receptor interaction netrin-1 receptor mutants served as useful tools to investigate adhesion, apoptosis, cell-signaling as well as neuronal outgrowth and guidance. Moreover pull down assays identified new extracellular netrin-1 ligands such as glypican, testican, slit-2, NDNF and laminins.