

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Jan Raja

Molekulární mechanismy semaforin-plexinové signalizace v navádění axonů

Molecular mechanisms of semaphorin-plexin signalization in axon guidance

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

Mgr. Daniel Rozbeský, PhD

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17.11.2024

Podpis

Seznam zkratek

Plxn – Plexin, zkratka využívaná pro savčí plexiny

SemaX – Semaforin, zkratka využívaná pro savčí semaforiny

GAP – Proteiny aktivující GTPázy (GTP->GDP)

GAP doména – doména plexinů s funkcí GAP proteinem

Nrp - Neurofilin

GTP – Guanosintrifosfát

GDP – Guanosindifosfát

RBD – doména interagující s aktivním Rho proteinem vázající GTP

Abstrakt

Semaforiny jsou signální molekuly, které interagují s receptory typu plexin, čímž spouštějí složité intracelulární kaskády, které regulují procesy, jako je růst axonů, migrace buněk, imunitní odpovědi a metastázování rakovinných buněk. Tato bakalářská práce se zaměřuje na semaforin-plexinovou signalizaci, konkrétně na studium struktury proteinů, které jsou klíčové pro tento signální systém. V této práci je kladen důraz na analýzu struktury semaforinů a plexinů, jejich vzájemné interakce a mechanismy, jakými ovlivňují buněčné procesy. Součástí práce je přehled současného stavu výzkumu v oblasti strukturální biologie těchto proteinů, včetně jejich krystalografických a cryo-EM studií, a popis jejich funkčních domén, které jsou klíčové pro signalizační dráhy. Dále je diskutován význam těchto proteinů v kontextu vývoje nervového systému a regulace imunitní odpovědi. Cílem práce je poskytnout komplexní přehled struktury a funkcí semaforů a plexinů a přispět k lepšímu pochopení jejich role v biologických procesech, což by mohlo vést k novým terapeutickým přístupům v oblasti onkologie a neurovědy.

Klíčová slova: Semaforin - Plexin - axon - buněčná signalizace - navádění axonu

Abstract

Semaphorins are signaling molecules that interact with plexin-type receptors, triggering complex intracellular cascades that regulate processes such as axonal growth, cell migration, immune responses, and cancer cell metastasis. This bachelor's thesis focuses on semaphorin-plexin signaling, specifically on the study of the structure of proteins that are key to this signaling system. In this study, emphasis is placed on the analysis of the structure of semaphorins and Plexins, their mutual interactions and the mechanisms by which they influence cellular processes. Part of the thesis is an overview of the current state of research in the field of structural biology of these proteins, including their crystallographic and cryo-EM studies, and a description of their functional domains, which are key to signaling pathways. Furthermore, the importance of these proteins is discussed in the context of the development of the nervous system, the regulation of the immune response. The aim of the work is to provide a comprehensive overview of the structure and functions of semaphores and Plexins and to contribute to a better understanding of their role in biological processes, which could lead to new therapeutic approaches in the field of oncology and neuroscience.

Key words: Semaphorin – Plexin – axon - cell signaling - axon guidance

Obsah

1. Úvod	1
2. Semaforiny	2
2.1. Sema doména	3
2.2. Dimerizace	5
2.3. Neuropilin.....	6
3. Plexiny	7
3.1. Struktura plexinů a jejich aktivace	7
4. Signalizace	10
4.1. Aktivace cytoplazmatické domény plexinů	12
5. Role semaforinů v neurobiologii	14
5.1. Role Sema-Plxn signalizace mimo nervovou soustavu	16
6. Závěr.....	16
7. Seznam literatury	18

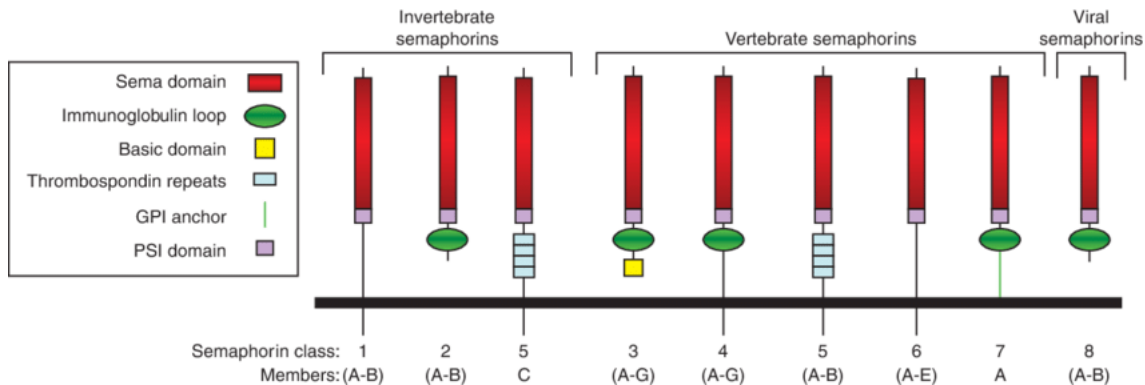
1. Úvod

Možek je základní nástroj pro člověka v jeho rozvoji a procesu poznávání. Právě i díky tomuto procesu vznikla potřeba člověka zjistit, jak tento potřebný orgán funguje. Již ve středověku vznikly neurovědy, jež na začátku byly pouze na úrovni filozofie. Po několika stoletích se z neurověd stal obor založený na faktech a experimentech. Navigace v rozvětvených a složitých strukturách neurálního vývoje a navádění axonů přitahovalo zvědavost stále více neurovědců a vyústilo ve spoustu objevů. Příběh začíná průkopnickými experimenty Santiaga Ramóna y Cajala¹, jehož pečlivá pozorování nervových okruhů položila základy moderní neurovědy. Koncem 19. a začátkem 20. století Cajalovy složité kresby a hypotézy poskytly časné pohledy na mechanismy, které jsou základem vedení axonů, když předpokládal existenci chemických podnětů, které řídí růst neuronálních procesů. Cajalova průkopnická práce inspirovala novou generaci neurovědců, včetně Rogera Sperryho, jehož elegantní experimenty v polovině 20. století způsobily revoluci v našem chápání vedení axonů. Sperryho klíčové studie o vizuálním systému žab a čolků prokázaly výjimečnou specifickou zaměřovanost axonů a odhalily pozoruhodnou schopnost rostoucích axonů procházet složitým prostředím, aby dosáhly svých vhodných cílů. Na základě Sperryho objevů se týmy výzkumníků ve druhé polovině 20. století pustily do pátrání po odhalení molekulárních mechanismů řídících vedení axonů². Tyto objevy položily základy pro objasnění složitých signálních drah, které regulují vedení axonů, což vyvrcholilo v identifikaci plexinů jako receptorů pro semaforiny v 90. letech 20. století. První objevený semaforin byl transmembránový Sema1A u sarančat³ a postupně přibývaly další proteiny. Objev semaforin-plexinové signalizace představoval posun v našem chápání vedení axonů, odhalující dynamickou souhru mezi extracelulárními naváděcími podněty a intracelulárními signalizačními kaskádami. Tato práce se zabývá semaforin-plexinovou signalizací při růstu axonů, zkoumá jednotlivé molekulární komponenty, signální dráhy a buněčné reakce, které jsou základem tohoto základního procesu. Dnes stále obsahuje tato oblast neurobiologie mnoho otázek a dalším výzkumem je možné se posunout k budoucím pokrokům jak v základním porozumění fungování mozku, tak v následném využití v klinické praxi.

2. Semaforiny

Semaforiny jsou skupina signálních proteinů, jež jsou nezbytné pro správný vývoj a údržbu mnoha orgánů a tkání. Pro tuto skupinu proteinů je typická cystein bohatá extracelulární N-terminální Sema doména⁴.

Třídy semaforinů jsou mezi živočichy strukturně i funkčně konzervované. Sekvence pro kódování semaforinů byly nalezeny v genech bezobratlých i obratlovců, dále také u některých virů. Naopak geny pro semaforiny neobsahují protozoa, rostliny a primitivní metazoa. U člověka najdeme 20 typů semaforinů. Tyto proteiny se rozdělují podle strukturní podobnosti do 8 tříd tj. 1-7 a V (obr. 1), přičemž u obratlovců nalezneme 3.-7. třídu. Třídy 1 a 2 se nachází pouze u bezobratlých a třídy V u virů. Sekretované semaforiny patří do 2. a 3. třídy. Proteiny ze třídy 1 a 3-6 jsou transmembránové a semaforin-7a je spojený s membránou přes GPI kotvu⁵.

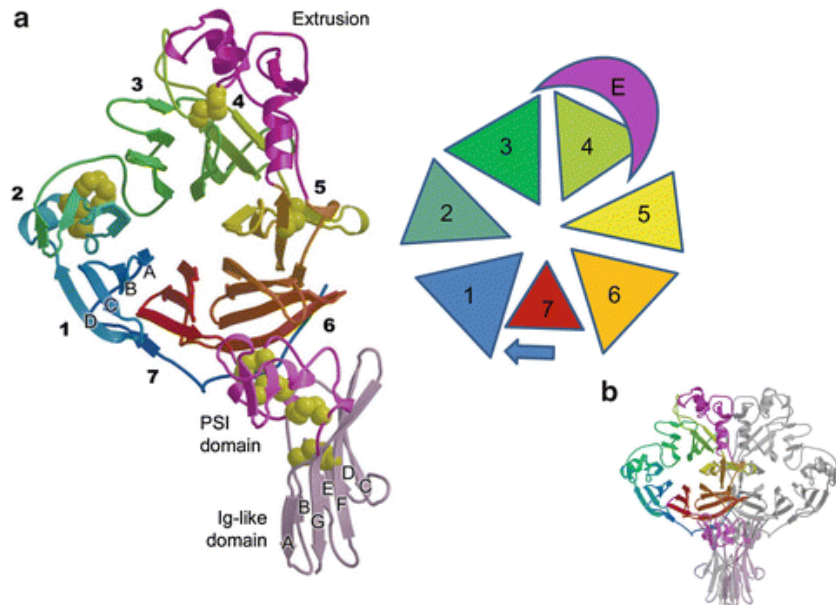


Obrázek 1 - Znárodnění struktury a pozice vůči membráně u jednotlivých typů semaforinů s barevně vyznačenými doménami, Sema doména (červeně), PSI doména (růžově), doména imunoglobulinová (zeleně), zásaditá doména (žlutě)⁶.

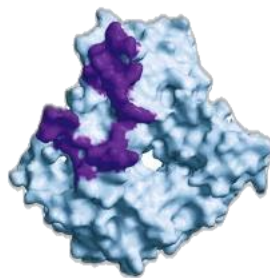
2.1. Sema doména

Třídy i typy semaforinů se strukturně liší, spojuje je však konzervovaná Sema doména (obr. 2 str. 4), kterou najdeme i u receptorů pro semaforiny, respektive u plexinů. Nachází se na N-konci proteinů. Typické pro tuto doménu je výskyt cysteinů tvořící 3 - 4 disulfidické můstky. Celkově je složena zhruba z 500 aminokyselin⁴. Cysteiny jsou v rámci všech rodin konzervované a samotná doména tvoří strukturu vrtule ze sedmi beta listů uskupených radiálně podle centrální roviny (obr 2 a str.4). Každý list je tvořen čtyřmi anti-paralelními beta-vlákný A-D⁷. Vlákno A tvoří vnitřní hranu kruhu, B a C vycházejí ven z kruhu a finální vlákno D tvoří vnější rovinu kruhu. Každé vlákno je tvořeno cca 70 aminokyselinami⁸. U Semaforinů nalezneme sekundární struktury kolem beta listů. Jedná se o přidané helixy, smyčky a vlákna. U Sema3a se nachází smyčky S a helixy H, které zvětšují celkový objem domény (1S1, 1H1, 2H1-2, 4H1, 5H1-3 a 5S5-6)⁸. U pátého listu se nachází oblast „extrusion“, která se výrazně podílí na dimerizaci (obr. 2 str. 4). Jedná se o 77 aminokyselinovou strukturu mezi vlákny C a D u listu 5⁹. Tato oblast je vysoce konzervovaná. Například u Sema4D spolu se smyčkami, díky své pozici nad rovinou kruhu, hrají velkou roli při dimerizaci¹⁰. Uzavření kruhu je pomocí struktury zvané smyčka a hák, kde dochází k interakci mezi prvním a posledním vláknem¹¹. Struktura je stabilizována čtyřmi disulfidickými vazbami. Existují i výjimky, kde počet disulfidických vazeb je rozdílný. Příkladem je Sema5A, kde najdeme 3 disulfidické vazby stabilizující vnitřní strukturu Sema domény¹². Doména podléhá postranlační modifikaci, konkrétně glykosylaci, která je nezbytná pro buněčný intracelulární i extracelulární transport a zároveň je důležitá pro ligand-receptor interakce. Asparaginové zbytky jsou na Sema doméně glykosylované například N-acetyl- β -D-glukosaminem. U Sema7a je glykosylovaných 5 míst: Asn 105, 157, 258, 330 a 602¹³.

Dnes je známo zatím pouze 6 krystalových struktur samotných Sema domén, mezi které patří například Sema3a (obr. 3 str. 4)¹⁴. Díky těmto modelům a metodám jako jsou kryo-EM (kryoelektronová mikroskopie), NMR spektroskopie (nukleární magnetická rezonance), SPR (povrchová plasmonová rezonance) a další můžeme studovat povrch proteinu, jeho elektrostatický náboj, vazebná místa a mnoho dalšího. Tyto znalosti nám umožňují zkoumat vazebná místa, interakce s jinými molekulami, mutace pro jejich pochopení a případnou nápravu.

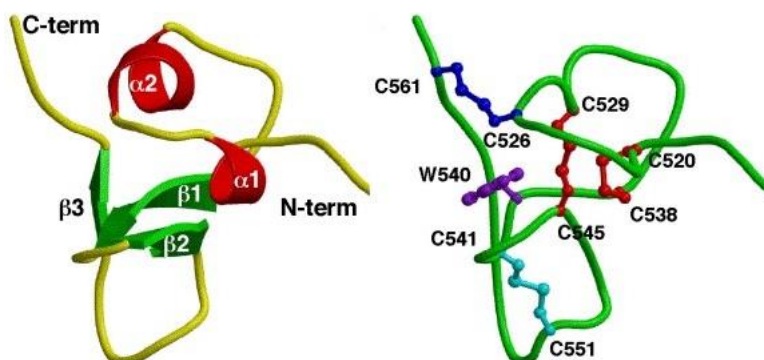


Obrázek 2 - Struktura semaforinů vizualizovaná pomocí sekundární struktury (helixů a β -skládaných listů). Sema doména je složená ze 7 beta listů radiálně s „extrusion“ oblastí mezi listy 4 a 5, následovaná PSI doménou a imunoglobuline-like doménou. (b) Vzájemná poloha extracelulárních domén semaforinů při dimerizaci¹⁵



Obrázek 3 - Vizualizace povrchu Sema domény semaforinu 3a vycházející z krystalové struktury. Fialově je znázorněn povrch podílející se na dimerizaci¹⁴

Na C-konec Sema domény navazuje PSI doména, která je složena zhruba z 60 aminokyselin s centrálním konzervovaným motivem CxWC osmi cysteinů, jež se podílí na tvorbě tří až čtyř disulfidických můstků v této doméně¹⁶. Tato doména se nachází u velkého množství signalizačních proteinů.¹⁷ Pomocí NMR spektroskopie byla zjištěna struktura PSI domény u Met receptorů¹⁷ (obr. 4).



Obrázek 4 - Struktura PSI domény u Met receptorů, s vyznačenými sekundárními strukturami a disulfidickými můstky¹⁷

U semaforinů třídy 2, 3, 4 a 7 nalezneme „immunoglobulin-like“ doménu. Tato Ig doména se podílí na dimerizaci¹⁸. U třídy 5 se nachází 7 opakujících se trombosmondinových domén¹⁸. Tato doména je důležitá pro signalizaci přes vazbu glykosaminoglykanů (GAG) a jiných afektorových molekul. U Sema5a rozhoduje přítomnost glykosaminoglykanů, heparan sulfátů a chondroitin sulfátů, zda se bude molekula chovat jako atraktant nebo inhibitor růstu axonů¹⁹.

2.2. Dimerizace

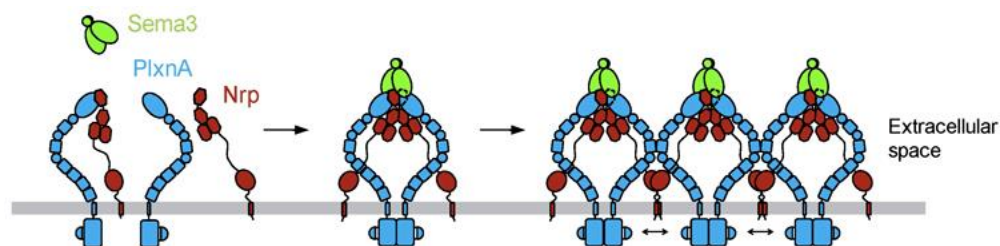
Pro semaforiny a jejich receptory je nezbytná dimerizace. Díky homodimerizaci komplexu a následné heterodimerizaci s jejich receptory příp. koreceptory, dochází k transdukci signálu²⁰. Homodimer semaforinu je tvořen překryvem „face-to-face“ Sema domény (obr. 2B str .4). Na interakci dvou kruhů Sema domény se podílí smyčky 4b–4c, 4d–5a and 5b–5c²¹. Stabilita komplexu je převážně zajištěna nekovalentními vazbami, avšak například u Sema4D je pro dimerizaci nezbytná tvorba disulfidického můstku na pozici Cys 723, který se nachází v Ig-Like doméně²². Na dimerizaci se podílí převážně Sema doména, přesto i jiné domény se podílí na

celkové stabilitě dimeru. U Sema4D se povrch Ig-like domény podílí zhruba 18 % z celkového povrchu dimeru⁹.

2.3. Neuropilin

Semaforiny třídy 3 vyžadují pro interakci s receptorem koreceptor – neuropilin²³. Neuropiliny jsou transmembránové glykoproteiny hrající významnou roli při fyziologických procesech. Jedná se o koreceptory pro semaforiny a VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor).

Semaforiny 3 mají oproti ostatním semaforinům nižší afinitu k receptoru PlxnA(1-4), avšak po vzniku stabilního komplexu PlxnA(1-4)-Nrp-1 (obr. 5 str. 7) se afinita k Sema3A zvýší²³. Byly identifikovány 2 typy neuropilinů, Nrp-1 a Nrp-2. Tyto dva typy mají v lidském organismu 44% sekvenční podobnost. Na N-konci byly objeveny 2 CUB domény, jež jsou důležité pro dimerizaci, 2 domény V/ VII homologie koagulačních faktorů a MAM doména. Tyto domény jsou důležité pro správnou interakci Sema3-neuropilin-PlxnA komplexu a pro následnou transdukcii signálu. MAM také zajišťuje protein-proteinovou interakci s membrin²⁴. MAM, někdy označovaná jako doména c neuropilinu, se podílí na homodimerizaci neuropilinů²⁵. Tato doména je také silně O-glykosylovaná až 24 monosacharidy²⁶. Stejně jako semaforiny i neuropiliny tvoří dimery, jež jsou tvořeny nekovalentními interakcemi oligomeru²⁷. Na vznikajícím komplexu Nrp-Sema3-Plxn se ze strany neuropilinu podílí a1 část CUB domény, která se váže na Sema doménu Sema3A a b1 část domény V/ VII homologie koagulačních faktorů, která se váže semaforiny²⁸. Různé studie prokázali variabilitu v párování, například k Nrp-1 se váže Sema3A, zatímco Sema3F a 3G se váží k Nrp-2. Nakonec Sema3B, Sema3C a Sema3D mohou tvořit komplex jak s Nrp-1, tak i s Nrp-2²⁹. Tyto vzniklé komplexy se pak mohou dále, pro transdukcii signálu a aktivaci kaskád, vázat na PlxnA1-4²⁶, nebo PlxnD1²⁷.



Obrázek 5 - Schéma vzniku komplexu Sema3-PlxnA-Nrp. Dva neuropiliny se vážou na dva plexiny a následná vazba Sema dimeru, Výsledkem je vytvoření komplexu Sema3:PlxnA:Nrp v poměru 2:2:2²⁸

3. Plexiny

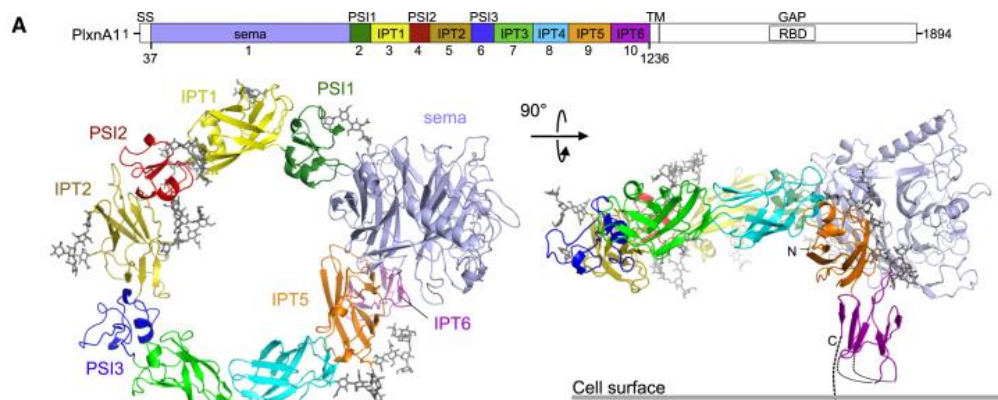
Plexiny jsou transmembránové receptory 1. typu, obsahují ektodomény, transmembránový helix a cytoplazmatickou doménu. Jedná se o membránové receptory pro semaforiny³⁰. Plexiny jsou rozděleny do čtyř rodin, A-D. V savčích buňkách jsou dále rozeznávány Plexiny A1-4, B1-3, C-1 a D-1³¹. Extracelulární doména slouží jako receptor pro semaforiny. Cytoplazmatická doména obsahuje GAP doménu transdukcující signál při aktivaci přes GTPázy Rap a RBD – doména interagující s aktivním Rho proteinem vázající GTP.

3.1. Struktura plexinů a jejich aktivace

Struktura plexinů obsahuje Sema doménu (obr. 6 str. 7), která je homologní v rámci rodin plexinů a semaforinů. Následně obsahuje krátkou PSI doménu a extracelulární IPT doménu. Krystalografické studie prokázaly kruhovou strukturu komplexu Sema domény a tří po sobě jdoucích PSI-IPT domén a následně tři samostatných IPT domén (obr.6). Tato stereotypická konformace se objevuje u všech známých plexinů s výjimkami například u PlxnB1 a PlxnC1, kde dochází k inzerci nebo delecii některých IPT a PSI domén³².

Jak již bylo řečeno semaforiny a plexiny sdílí Sema doménu. V obou případech tvoří doména strukturu vrtule ze sedmi beta listů, kdy každý je tvořen 4 antiparalelními beta vlákny³³. Jejich podobnost v pořadí aminokyselin je však nízká. Po Sema doméně následuje PSI doména. Tato doména je složena z cca 50 aminokyselin, obsahující 8 cysteinů s konzervovaným motivem CxWC³⁴. Následují IPT domény, obsahující zhruba 95 aminokyselin.

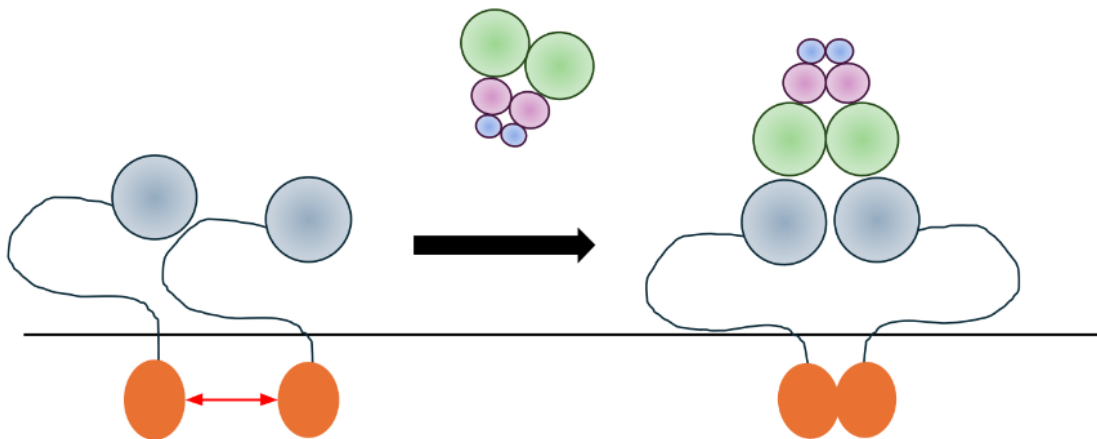
V intracelulárním prostředí se nachází GAP doména, jež je homologní k p120GAP proteinu, jehož úlohou je aktivace GTPasové aktivity proteinu Ras. GAP doména plexinů obsahuje pro Ras GAP proteiny typický „argininový prst“, na rozdíl od tradičních Rap GAP proteinů ji chybí „asparaginový palec“³⁵. GAP doména je rozdělena na dva úseky C1 a C2³⁶ a mezi dvěma homologními GAP úseky se nachází RBD doména interagující s aktivním Rho proteinem vázajícím GTP (obr. 8 str.10). Rodina Rho malých GTPáz, jsou signální molekuly, které se podílí na přestavbě aktinového cytoskeletu³⁷. Aktivace Rho GTPázy vyžaduje záměnu GDP na GTP.



Obrázek 6 - Krystalová struktura extracelulární oblasti plexinů. 6A – znázornění posloupnosti jednotlivých domén v nativní konformaci uzavřeného kruhu³⁸

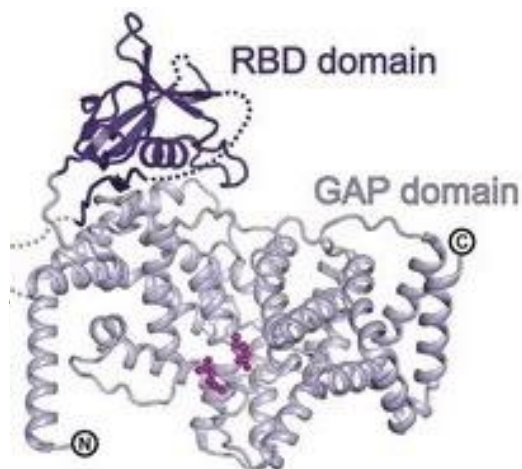
V neaktivním stavu se plexiny nacházejí v autoinhibovaném stavu v dimerizované formě (obr.7 str. 9). K tomuto ději dochází jako prevence před spontánní signalizací pomocí GAP domén, jež v autoinhibovaném stavu nemohou interagovat se signálními molekulami³⁹. Této poloze se říká „hlava-stonek“, jelikož se Sema doména neboli „hlava“ jednoho plexinu váže na PSI a IPT

domény neboli „stonek“ druhého plexinu. V této konformaci jsou GAP domény od sebe vzdáleny a nemůže dojít k interakci. Po navázání semaforinů, dochází k rotaci membránového helixu o 180°. Tím dojde k přiblížení GAP domén a zároveň se zvětší jejich přístupnost pro GTPázy a jiné signalizační molekuly (Obr. 7)⁴⁰.



Obrázek 7- Schematické znázornění plexinů v autoinhibovaném stavu a změna konformace při aktivaci semaforiny. Šedá barva – Sema doména plexinů, zelená barva – Sema doména semaforinů, oranžová barva – cytoplazmatická doména plexinů, modrá barva – Nrp.

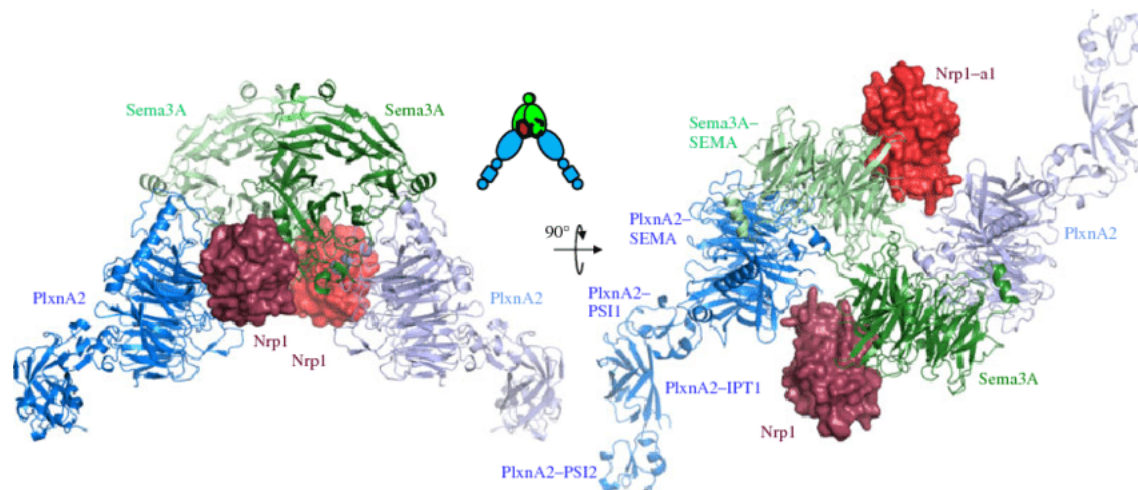
Po navázání GTPázy na ³⁵³⁶³⁷GAP doménu se GTPázová aktivita urychluje a výsledkem je, že GTPáza má navázané GDP. Plexiny prostřednictvím GAP domény aktivují Rap protein, který následně hydrolyzuje GTP na GDP a stává se tak následně nepřístupným pro další vazebné partnery⁴¹. RBD doména interaguje s Rac1, Rnd1 a RhoD GTPázami³⁶. GTPázy jsou důležité jako molekulární přepínače a hrají roli při remodelaci aktinového cytoskeletu, buněčné migrace a celkové morfologie.



Obrázek 8 - Struktura cytoplazmatické domény plexinů obsahující RBD doménu pro vazbu RhoGTPáz, a aktivační GAP doménu⁴²

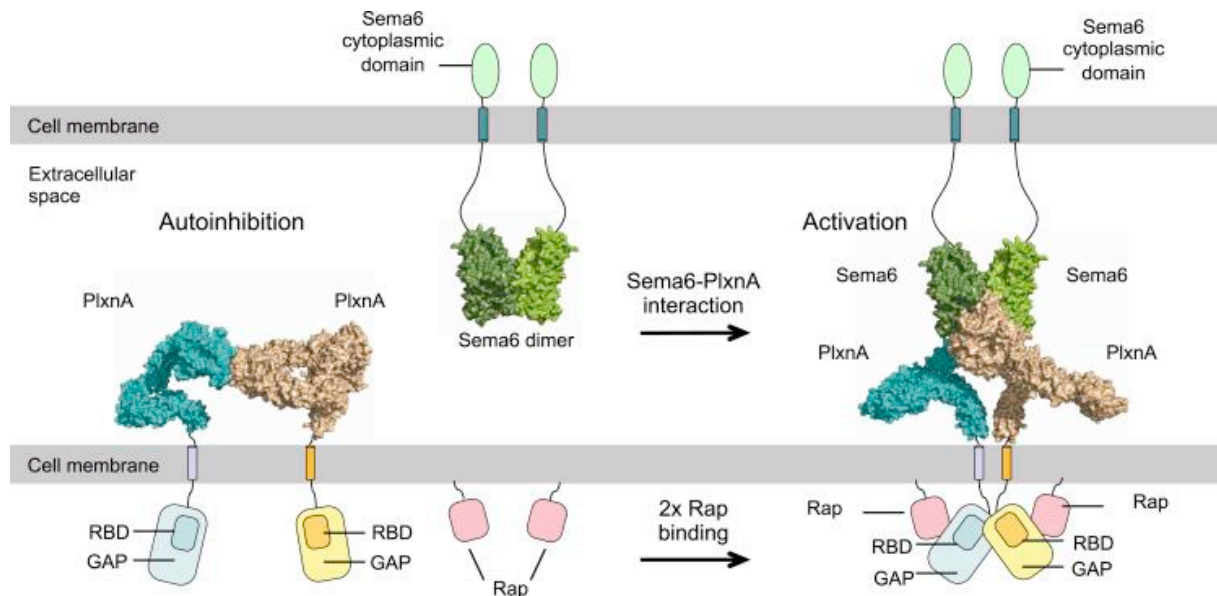
4. Signalizace

Zásadní roli při signalizaci hraje již zmíněná dimerizace komplexů, jež má za následek vznik signálních drah, a tudíž i navádění axonů. Aktivace plexinů, receptorů pro semaforiny, je zprostředkována přes semaforin-indukovanou dimerizaci. Na dimerizaci semaforinů se především podílí Sema doména a IPT domény plexinů⁴³. PSI doména nemá na dimerizaci vliv. Plexiny nacházející se v dimerním stavu jsou v základní konformaci neaktivní. Po vazbě semaforinového dimeru se vzájemná orientace plexinů v dimerní formě mění v konformaci „hlava-hlava“. Na spojení komplexních struktur se hlavně podílí listy 1 a 5 Sema domén obou proteinů⁴³. Následně vzniká heterotetramer v poměru 2:2 (SemaX:Plxn). U Sema3 závisí signalizace ještě na koreceptorech Nrp1-2. Sema3 je receptorem pro Nrp. Dimer semaforinů tak váže dvě molekuly Nrp a vzniká holoreceptor zásadní pro následující vazbu plexinů⁴⁴. Výsledkem je komplex 2:2:2 Sema-Nrp-Plxn (obr.9 str. 11).



Obrázek 9 - Struktura kryo-EM komplexu dimerů PlxnA2 (modrá barva) , Sema3A (zelená barva) : Nrp1 (červená barva)⁴⁵

Interakce komplexu semaforin-plexin může být ve stavu cis nebo trans⁴⁶. Při interakci trans jsou semaforiny a jejich receptory prezentovány na dvou membránách různých buněk (obr. 10 str. 12). Cis interakce je podmíněná přítomností obou proteinů na jedné cytoplazmatické membráně. Tato forma interakce byla popsána u semaforinů třídy 6 a jejich receptorů PlxnA1 a také u PlxnB1⁴⁷. Konformace cis u plexinů má významnou roli při autoinhibici plexinu, což zabraňuje předčasné aktivaci signální kaskády⁴⁸. V tomto stavu jsou aktivní místa schovaná v proteinu. Při aktivaci se předpokládá konformační změna v cytoplazmatické doméně, kde dochází ke stočené konformaci a následné aktivaci².



Obrázek 10 – Transaktivace a dimerizace jednotlivých komponentů plexin-semaforin signální kaskády před a po aktivaci. Plexiny se nachází v neaktivním dimeru. Po navázání Sema dimeru, se mění jejich konformace na „hlava-hlava“ aktivní stav⁴⁸.

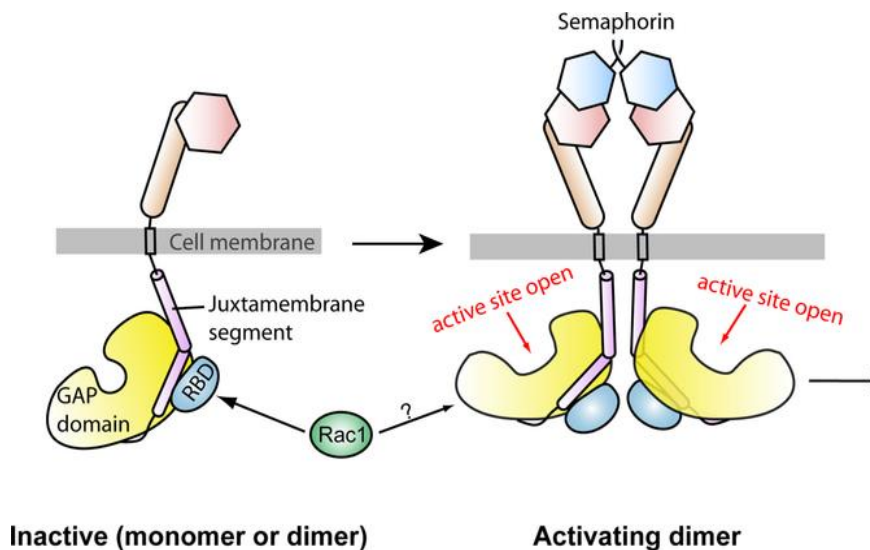
4.1. Aktivace cytoplazmatické domény plexinů

Cyklus GTP představuje klíčový regulační mechanismus malých GTPáz, které fungují jako molekulární přepínače v buněčných signálních drahách⁴⁹. V aktivním stavu je GTP vázáno na GTPázu, což umožňuje její interakci s efektorovými proteiny a spuštění specifických buněčných reakcí. Tento proces je regulován dvěma hlavními typy proteinů: GEF (guaninnukleotid-výměnné faktory), které podporují výměnu GDP za GTP, a GAP (GTPázy-aktivační proteiny), které zvyšují rychlost hydrolyzy GTP na GDP, čímž přepínají GTPázu do neaktivního stavu⁵⁰. Tímto způsobem je zajištěna dynamická a přesná kontrola buněčných procesů, jako je cytoskeletální reorganizace, buněčná migrace a signalizace.

Aktivace GAP domény plexinů vyžaduje nejen extracelulární vazbu semaforinu na receptorovou doménu plexinu, ale také interakci malých GTPáz z rodiny Rho s Rho-binding doménou (RBD) (obr. 11 str. 13)⁵¹. GAP doména využívá malé GTPázy, jako je Rap, které hrají

zásadní roli při regulaci růstu neuronů skrze přestavbu aktinového cytoskeletu ⁵². Signalizace prostřednictvím Plexinů je závislá na inaktivaci Rap proteinů, které v aktivním stavu (vázané na GTP) podporují například aktivaci integrinů ⁵³. Hydrolýzou GTP na GDP, zprostředkovanou GAP doménou, dochází k inaktivaci Rap proteinů, což vede k inaktivaci například integrinů a následně k buněčné repulzi.

RBD doména, která je strukturálně vložena do GAP domény cytoplazmatické části plexinů, váže malé GTPázy rodiny Rho, jako jsou Rnd1, Rac1 a RhoD ⁵³. Tyto GTPázy mají různé efekty v rámci signální dráhy. Například zvýšená exprese Rac1 zvyšuje semaforinem zprostředkovanou interakci plexinu, což vede k vyšší aktivaci signalizace ⁵⁴. Naopak nadměrná exprese Rnd1 může způsobit buněčný kolaps dokonce i při absenci semaforinu ⁵⁵. Tento komplexní regulační systém umožňuje plexinům přesně kontrolovat klíčové buněčné procesy a zprostředkovávat adaptivní reakce na extracelulární podněty⁴⁹⁵⁰⁵¹⁵²⁵³⁵⁴⁵⁵

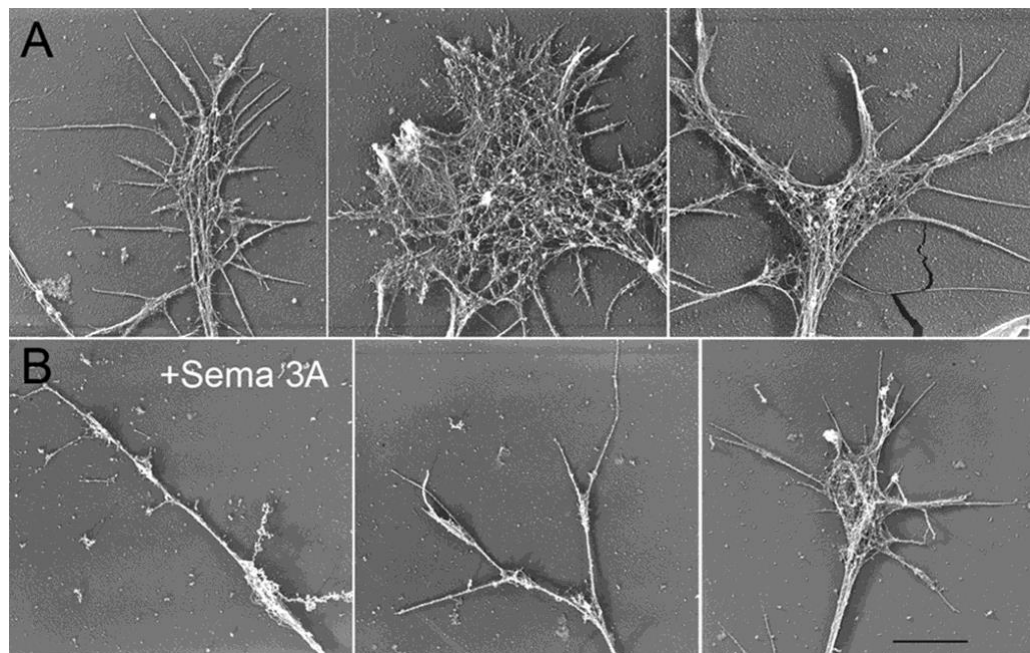


Obrázek 11- Schéma aktivace cytoplazmatické domény. Dimerizací dojde ke změně konformace a uvolnění aktivního místa pro RapGAP aktivitu⁵⁶.

Celkem bylo zatím objeveno 20 proteinů interagujících s cytoplazmatickou doménou⁵⁷. Výsledkem aktivace cytoplazmatické oblasti je aktivace intracelulárních proteinů a druhých posílů, které mají vliv na polymerizaci příp. depolymerizaci aktinu a tím přestavbu buněk. Hlavní rolí při tomto ději jsou malé GTPázy vázané RBD doménou⁵⁸. Přesný mechanismus přenosu signálu z plexinů vedoucí k změnám v aktinovém cytoskeletu není znám.

5. Role semaforinů v neurobiologii

Sema-Plxn signalizace, jak již bylo zmíněno je podstatná pro navádění nervových růstových kuželů, vývoj a konektivitu dendritů. Po aktivaci přechází signál přes GTPázy a molekulární přepínače na cytoskelet. Dalším příkladem molekul propojující extracelulární signál na intramolekulární následky jsou Rho GTPázy Rac1, RhoA a Cdc42⁵⁹. Aktivace RhoA, vede ke kolapsu růstového kuželu. Tato molekula je spojená s repulzivním signálem hlavně se Sema3A, kde aktivita RhoA způsobuje odklonění od zdroje semaforinu⁶⁰. Rac1 je inhibována aktivitou plexinů, což zamezuje aktinové polymerizaci a limituje extenzi růstového kužele⁶¹. Dokud nedojde k aktivaci, plexiny podporují RhoA signalizaci a inhibují Rac1, což vede k celkové depolymerizaci, zvyšuje aktino-myosinovou kontrakci a stažení filopodií a lamelipodií. Tato retrakce je typicky viditelná u repulzivních signálů Sema3A, které aktivují PlxnA1 signalizaci⁶². Extrémním příkladem u této signalizační dráhy je celkový kolaps celkového neuritu (obr.12 str. 15).



Obrázek 12 - Záběry z mikroskopu buněk z populací před a po přidání Sema3A, u takových buněk dochází ke kolapsu neuritu⁶³

Plexiny ovlivňují i funkci mikrotubulů, jež jsou důležité pro stabilitu a pohyb růstového kužele. Proteiny, jež jsou mediátorem mezi Sema-Plxn a buněčnou odpovědí jsou například CRMP2, tj. protein mediátor odpovědi na kolapsin/semaforin. Tyto proteiny jsou důležité pro stabilitu mikrotubulů⁶⁴. Fosforylace tohoto proteinu indukovaná Sema3A narušuje uskupení mikrotubulů, podporující kolaps kužele.

Integriny, jež zprostředkovávají buněčnou adhezi k extracelulární matrix (ECM), jsou další skupinou proteinů podílejících se na přestavbě neuronu v oblasti růstového kužele. Hlavní molekuly, které ovlivňuje jsou například fibronektin, laminin a kolagen. Ovlivňováním integrin-ECM dynamiky pomáhají semaforiny ve správném navádění růstového kužele díky lokálnímu uvolnění spojů, kde vzniká vedoucí a koncová hrana buňky⁶⁵. Snižují vazbu přilnutí a snadnějšího oddělení buněk. Sema3A-PlxnA1 signalizace snižuje aktivitu integrinů a tím retrakci od ECM komponentů⁶⁶.

5.1. Role Sema-Plxn signalizace mimo nervovou soustavu

Přítomnost signální dráhy semaforinů je důležitá pro organogenezi zárodku. Mezi soustavy, kde se semaforiny podílí na správném vývoji, patří nervová, ale také i kardiovaskulární a imunitní⁶⁷. Tyto role si můžeme předvést na několika příkladech. Základní funkcí je navádění axonů např.: Sema3A, který má dvojitý efekt, zamezuje růstu axonů a naopak podporuje růst dendritů⁶⁸. Semaforiny také hrají roli v angiogenezi, hlavně semaforiny třídy 3 Sema3E podporuje větvení cév. Sema3A naopak inhibuje migraci endoteliálních buněk⁶⁹. Nezbytnou roli hrají semaforiny i v imunitním systému. Zde se semaforiny produkují na T-buňkách, aktivovaných B-buňkách a dendritických buňkách⁷⁰. V lymfoidních tkáních váže Sema4D jiný receptor než v nervové soustavě. Jedná se o CD72⁷¹. Výsledkem je aktivace B-buněk. Mezi imunoaktivní semaforiny patří dále i Sema3A, Sema4A, Sema6D, Sema7A⁷².

6. Závěr

Semaforin-plexinová signalizace představuje klíčový mechanismus v řízení růstu a směřování neuronálních růstových kuželů během vývoje nervového systému. Tento signální systém, který zahrnuje řadu interakcí mezi semaforiny, jejich receptory – především Plexiny – a dalšími buněčnými proteiny, řídí nejen přímý pohyb růstových kuželů, ale také komplexní dynamiku aktinového a mikrotubulárního cytoskeletu, která je nezbytná pro správné cílení axonů. Na základě přijatých signálů, často v kombinaci s dalšími molekulami jako jsou integriny, dochází k řízenému rozkladu nebo tvorbě adhezních kontaktů s extracelulární matrix, což umožňuje růstovým kuželům flexibilně reagovat na měnící se podmínky a růst přesně ve směru cílové buňky.

Důležitost semaforinové-plexinové signalizace se projevuje nejen během vývoje, ale i v dospělém mozku, kde přispívá k udržování synaptické plasticity a může hrát roli při regeneraci neuronů po poškození. Porozumění těchto signálních dráh má proto velký význam nejen pro základní výzkum vývoje nervového systému, ale i pro potenciální terapeutické aplikace, zejména v kontextu neurodegenerativních onemocnění a nervové regenerace. Důkladné pochopení

semaforin-plexinové signalizace a jejích molekulárních mechanismů nám může v budoucnu umožnit efektivnější léčbu poruch, kde je správné vedení a růst neuronů klíčovým faktorem pro obnovu funkcí nervového systému.

Důkladné porozumění této signalizační síti otevírá nové možnosti pro vývoj terapeutických přístupů, které by mohly cíleně ovlivnit chování buněk, a tím přispět k lepšímu zvládnání nemocí, jako jsou rakovina, neurodegenerativní poruchy nebo imunitní dysfunkce. Vzhledem k složitosti a vzájemným interakcím mezi plexiny, semaforey a dalšími signálními molekulami je nutné pokračovat v detailním zkoumání těchto drah, což umožní nejen rozšíření našich základních biologických znalostí, ale i aplikaci těchto poznatků v oblasti medicíny a farmacie.

7. Seznam literatury

1. Hollis, E. R. Axon Guidance Molecules and Neural Circuit Remodeling After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* **13**, 360 (2016).
2. Meyer, R. L. Roger Sperry and his chemoaffinity hypothesis. *Neuropsychologia* **36**, 957–980 (1998).
3. Kolodkin, A. L. *et al.* Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* **9**, 831–845 (1992).
4. Kolodkin, A. L., Matthes, D. J. & Goodman, C. S. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* **75**, 1389–1399 (1993).
5. Bamberg, J. A. *et al.* Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* **97**, 551–552 (1999).
6. Neufeld, G., Sabag, A. D., Rabinovicz, N. & Kessler, O. Semaphorins in angiogenesis and tumor progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, (2012).
7. Siebold, C. & Jones, E. Y. Structural insights into semaphorins and their receptors. *Semin Cell Dev Biol* **24**, 139–145 (2013).
8. Antipenko, A. *et al.* Structure of the Semaphorin-3A receptor binding module. *Neuron* **39**, 589–598 (2003).
9. Love, C. A. *et al.* The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D. *Nature Structural & Molecular Biology* **2003 10:10** **10**, 843–848 (2003).
10. Liu, H. *et al.* Structural Basis of Semaphorin-Plexin Recognition and Viral Mimicry from Sema7A and A39R Complexes with PlexinC1. *Cell* **142**, 749–761 (2010).
11. Fülöp, V. & Jones, D. T. β Propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 715–721 (1999).
12. Nagy, G. N. *et al.* Structure and function of Semaphorin-5A glycosaminoglycan interactions. *Nature Communications* **2024 15:1** **15**, 1–16 (2024).
13. Liu, Z. *et al.* FUT8-mediated aberrant N-glycosylation of SEMA7A promotes head and neck squamous cell carcinoma progression. *International Journal of Oral Science* **2024 16:1** **16**, 1–16 (2024).
14. Antipenko, A. *et al.* Structure of the Semaphorin-3A Receptor Binding Module. *Neuron* **39**, 589–598 (2003).

15. Yvonne Jones, E. Structure of semaphorins and their receptors. *Semaphorins: A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities* 87–107 (2015) doi:10.1007/978-4-431-54385-5_5/FIGURES/4.
16. Bork, P., Doerks, T., Springer, T. A. & Snel, B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* **24**, 261–263 (1999).
17. Kozlov, G. *et al.* Insights into function of PSI domains from structure of the Met receptor PSI domain. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 234–240 (2004).
18. Alto, L. T. & Terman, J. R. Semaphorins and their Signaling Mechanisms. *Methods Mol Biol* **1493**, 1 (2017).
19. Nagy, G. N. *et al.* Structure and function of Semaphorin-5A glycosaminoglycan interactions. *Nature Communications* 2024 15:1 **15**, 1–16 (2024).
20. Koppel, A. M. & Raper, J. A. Collapsin-1 Covalently Dimerizes, and Dimerization Is Necessary for Collapsing Activity. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 15708–15713 (1998).
21. Gherardi, E., Love, C. A., Esnouf, R. M. & Jones, E. Y. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 669–678 (2004).
22. Klostermann, A., Lohrum, M., Adams, R. H. & Püschel, A. W. The Chemorepulsive Activity of the Axonal Guidance Signal Semaphorin D Requires Dimerization. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7326–7331 (1998).
23. Takahashi, T. *et al.* Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* **99**, 59–69 (1999).
24. Yelland, T. & Djordjevic, S. Crystal Structure of the Neuropilin-1 MAM Domain: Completing the Neuropilin-1 Ectodomain Picture. *Structure* **24**, 2008–2015 (2016).
25. Janssen, B. J. C. *et al.* Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1293 (2012).
26. Windwarder, M., Yelland, T., Djordjevic, S. & Altmann, F. Detailed characterization of the O-linked glycosylation of the neuropilin-1 c/MAM-domain. *Glycoconj J* **33**, 387–397 (2016).
27. Takahashi, T., Nakamura, F., Jin, Z., Kalb, R. G. & Strittmatter, S. M. Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nature Neuroscience* 1998 1:6 **1**, 487–493 (1998).
28. Janssen, B. J. C. *et al.* Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1293–1299 (2012).
29. Chen, H., Chédotal, A., He, Z., Goodman, C. S. & Tessier-Lavigne, M. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* **19**, 547–559 (1997).
30. Kruger, R. P., Aurandt, J. & Guan, K. L. Semaphorins command cells to move. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:10 **6**, 789–800 (2005).

31. Tamagnone, L. *et al.* Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* **99**, 71–80 (1999).
32. Junqueira Alves, C., Yotoko, K., Zou, H. & Friedel, R. H. Origin and evolution of plexins, semaphorins, and Met receptor tyrosine kinases. *Sci Rep* **9**, (2019).
33. Gherardi, E., Love, C. A., Esnouf, R. M. & Jones, E. Y. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 669–678 (2004).
34. Bork, P., Doerks, T., Springer, T. A. & Snel, B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* **24**, 261–263 (1999).
35. Scheffzek, K. *et al.* The Ras-RasGAP complex: Structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science* (1979) **277**, 333–338 (1997).
36. Scheffzek, K., Lautwein, A., Kabscht, W., Ahmadian, M. R. & Wittinghofer, A. Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature* **384**, 591–596 (1996).
37. Khrenova, M. G., Grigorenko, B. L., Kolomeisky, A. B. & Nemukhin, A. V. Hydrolysis of Guanosine Triphosphate (GTP) by the Ras-GAP Protein Complex: Reaction Mechanism and Kinetic Scheme. *J Phys Chem B* **119**, 12838–12845 (2015).
38. Kong, Y. *et al.* Structural Basis for Plexin Activation and Regulation. *Neuron* **91**, 548–560 (2016).
39. He, H., Yang, T., Terman, J. R. & Zhang, X. Crystal structure of the plexin A3 intracellular region reveals an autoinhibited conformation through active site sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 15610–15615 (2009).
40. Kuo, Y.-C. & Zhang, X. Regulation of Plexin: A Ring of Structural Twists and Turns. *Neuron* **91**, 497–499 (2016).
41. Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865–877 (2007).
42. Siebold, C. & Jones, E. Y. Structural insights into semaphorins and their receptors. *Semin Cell Dev Biol* **24**, 139–145 (2013).
43. Janssen, B. J. C. *et al.* Structural basis of semaphoring-plexin signalling. *Nature* **467**, 1118–1122 (2010).
44. Kolodkin, A. L. *et al.* Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**, 753–762 (1997).
45. Jones, E. Y. Understanding cell signalling systems: Paving the way for new therapies. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **373**, (2015).
46. Bessa, P. *et al.* Semaphorin heterodimerization in cis regulates membrane targeting and neocortical wiring. *Nature Communications* 2024 15:1 **15**, 1–19 (2024).

47. Rozbesky, D. *et al.* Structural basis of semaphorin-plexin cis interaction. *EMBO J* **39**, e102926 (2020).
48. Kong, Y. *et al.* Structural Basis for Plexin Activation and Regulation. *Neuron* **91**, 548 (2016).
49. Song, S. *et al.* Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian J Pharm Sci* **14**, 30 (2018).
50. Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865–877 (2007).
51. Wang, Y. *et al.* Plexins are GTPase-activating proteins for Rap and are activated by induced dimerization. *Sci Signal* **5**, (2012).
52. Pascoe, H. G., Wang, Y. & Zhang, X. Structural mechanisms of plexin signaling. *Prog Biophys Mol Biol* **118**, 161–168 (2015).
53. Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H. & Negishi, M. The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science (1979)* **305**, 862–865 (2004).
54. Vikis, H. G., Li, W. & Guan, K. L. The plexin-B1/Rac interaction inhibits PAK activation and enhances Sema4D ligand binding. *Genes Dev* **16**, 836–845 (2002).
55. Zanata, S. M., Hovatta, I., Rohm, B. & Püschel, A. W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *Journal of Neuroscience* **22**, 471–477 (2002).
56. Wang, Y. *et al.* Plexins are GTPase-activating proteins for Rap and are activated by induced dimerization. *Sci Signal* **5**, (2012).
57. Pascoe, H. G., Wang, Y. & Zhang, X. Structural mechanisms of plexin signaling. *Prog Biophys Mol Biol* **118**, 161–168 (2015).
58. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635 (2002).
59. Ito, Y., Oinuma, I., Katoh, H., Kaibuchi, K. & Negishi, M. Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3 β through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep* **7**, 704–709 (2006).
60. Swiercz, J. M., Kuner, R., Behrens, J. & Offermanns, S. Plexin-B1 Directly Interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to Regulate RhoA and Growth Cone Morphology. *Neuron* **35**, 51–63 (2002).
61. Hu, H., Marton, T. F. & Goodman, C. S. Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron* **32**, 39–51 (2001).
62. Kong, Y. *et al.* Structural Basis for Plexin Activation and Regulation. *Neuron* **91**, 548 (2016).
63. Bridgman, P. C. Using Rotary Shadow Electron Microscopy to Characterize Semaphorin-Mediated Growth Cone Collapse. *Methods in Molecular Biology* **1493**, 185–194 (2017).

64. Uchida, Y. *et al.* Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells* **10**, 165–179 (2005).
65. Serini, G. *et al.* Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 2003 424:6947 **424**, 391–397 (2003).
66. Genda, T., Sakamoto, M., Ichida, T., Asakura, H. & Hirohashi, S. Loss of Cell-Cell Contact Is Induced by Integrin-Mediated Cell-Substratum Adhesion in Highly-Motile and Highly-Metastatic Hepatocellular Carcinoma Cells. *Laboratory Investigation* 2000 80:3 **80**, 387–394 (2000).
67. Gay, C. M., Zygmunt, T. & Torres-Vázquez, J. Diverse functions for the semaphorin receptor PlexinD1 in development and disease. *Dev Biol* **349**, 1–19 (2011).
68. Shelly, M. *et al.* Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron* **71**, 433–446 (2011).
69. Miao, H. Q. *et al.* 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* **146**, 233–241 (1999).
70. Elhabazi, A., Marie-Cardine, A., Chabbert-de Ponnat, I., Bensussan, A. & Boumsell, L. Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. *Crit Rev Immunol* **23**, 65–81 (2003).
71. Kumanogoh, A. *et al.* Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: A novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* **13**, 621–631 (2000).
72. Takamatsu, H., Okuno, T. & Kumanogoh, A. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. *Cell Mol Immunol* **7**, 83 (2010).