

Strukturbasierte Analyse calciumcoordinierender Proteine an der Synapse

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biochemiker Carsten Reißner
(akad. Grad, Vorname, Name/Geburtsname)

geb. am 25.12.1964 in Laupheim

Gutachter: Prof. Dr. Markus Missler
(akademischer Grad, Vorname, Name)

Prof. Dr. Beat Schwaller
(akademischer Grad, Vorname, Name)

eingereicht am: 26.08.2008

verteidigt am: 30.01.2009

Carsten Reißner
Tiestestr. 21
30171 Hannover

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema:

Strukturbasierte Analyse calciumkoordinierender Proteine an der Synapse

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Münster, den 21. August 2008

Carsten Reißner

Für Lara und Pia

"Ever tried. Ever failed. No matter. Try again, Fail again. Fail better."
Samuel Beckett

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Missler bedanken, der es mir ermöglichte nach langer Zeit wieder experimentelle Biochemie zu betreiben, an das in mich gesetzte Vertrauen und die konstruktive und motivierende Kritik, die auch die schwierigeren Phasen der Arbeit zu meistern half.

Prof. Dr. Eckart Gundelfinger möchte ich danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe an einer Vielzahl von Projekten mitwirken und meine Fähigkeiten und Kenntnisse auf dem Gebiet der Strukturanalyse erfolgreich einbringen durfte.

Dipl.-Biochemiker Martin Klose für seinen unermüdlichen Einsatz für unsere gemeinsame Veröffentlichung und seine Freundschaft.

Dr. Michael Kreutz, PD Dr. Constanze Seidenbecher, Dr. Karl-Heinz Smalla, Dr. Uli Thomas, Dr. Thomas Dresbach, Dr. Wilko Altmann, Dr. Anna Kachalova, Dr. Susanne Ebisch, Dr. Daniela Dietrich, Dr. Marco Landwehr, Dr. Werner Zuschratter und Dr. Rainer Pielot für die angenehme Zeit am IfN, die Freundschaft und den erfolgreichen Abschluss mehrerer Projekte.

Prof. Craig Garner für seine finanzielle Unterstützung und der intensiven wissenschaftlichen Erfahrungen im HFSP Projekt.

Dr. Kerstin Piechotta für die Wiedereinführung in die molekularbiologischen Protokolle.

Dr. Henriette Masius, Dr. Mohi Ahmad, Dr. Richard Fairless und Sandra Gerke für das angenehme und produktive Arbeitsklima in Göttingen.

Dr. Schlote für die Bereitstellung des Isotopenlabors am PCI in Göttingen.

Dr. Benseler und sein Team für die umfangreichen Oligosynthesen und Sequenzierungen am MPI, Göttingen.

Ilka Wolff und Kai Kerkhoff für ihre Unterstützung im Laboralltag in Münster.

Dr. Astrid Rohlmann für Ihren Einsatz und die Unterstützung durch die Nachmittagsbetreuung von Pia.

Ich danke meinen Kindern Pia und Lara, dass sie mich trotz Sommerferien noch haben schreiben lassen. Miranda für ihre Liebe. Meinen Eltern und meiner Oma für ihre finanzielle Unterstützung, wenn es nötig war.

1	Einleitung	15
1.1	Die chemische Synapse als bi-direktionale Kommunikationsschnittstelle zwischen zwei Neuronen.....	16
1.2	EF Hand Proteine sind prototypische Calciumbindungsproteine	18
1.3	Neurexin/Neuroigin Komplex.....	21
1.4	Modellbau und Funktionsanalyse von Proteinen unbekannter Struktur	24
1.5	Zielsetzung	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Abkürzungen	29
2.2	Material	31
2.2.1	Geräte.....	31
2.2.2	Chemikalien.....	32
2.2.3	Oligonukleotide	34
2.2.4	Bakterienstämme	37
2.2.5	Flüssigmedien und Zusätze	37
2.2.6	Zellkulturen und Säuger	37
2.2.7	Antikörper.....	37
2.2.8	Vektoren.....	38
2.3	Methoden.....	38
2.3.1	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.3.1.1	Herstellung von Vektoren und deren Mutationen	38
2.3.1.2	Allgemeines Protokoll für Klonierungen und gezielte Mutagenesen	40
2.3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Expand™ High Fidelity System	41
2.3.1.4	In vitro Mutagenese mit dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit.....	42
2.3.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA zur 'Express-Mini'-Analyse.....	43
2.3.1.6	Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA ("Q-Mini").....	44
2.3.1.7	Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA (Q-Maxi).....	44
2.3.1.8	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (QiaEx II).....	45
2.3.1.9	Phenol-Chloroform-Extraktion	45
2.3.1.10	Ethanol-Präzipitation von DNA	45
2.3.1.11	Restriktionsendonuklease-Verdau von DNA	46
2.3.1.12	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	46
2.3.1.13	Ligation von DNA-Fragmenten	46
2.3.1.14	Herstellung elektroporationskompetenter Bakterien.....	47
2.3.1.15	Elektrotransformation von Bakterien.....	47
2.3.1.16	Konzentrationsbestimmung von DNA	48
2.3.1.17	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen.....	48
2.3.1.18	Agarose-Gelelektrophorese.....	48
2.3.2	Zellbiologische Methoden	48
2.3.2.1	Erhaltung einer COS-7 Zellkultur	49
2.3.2.2	Transfektion von COS-7 Zellen nach der DEAE-Method	49
2.3.2.3	Herstellung von COS-7 Zell-Lysaten.....	50
2.3.2.4	Gewinnung von COS-7 Medien mit sekretierten löslichen IgG-Fusionsproteinen.....	50
2.3.2.5	Oberflächenmarkierung lebender Zellen.....	50

2.3.3	Proteinbiochemische Methoden	50
2.3.3.1	Herstellung von Tierhirnlysaten	51
2.3.3.2	Immunopräzipitation (pulldown) von IgG-Fusionsproteinen mit Protein A	51
2.3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.3.3.4	Proteintransfer auf Nitrocellulosepapier	52
2.3.3.5	Nachweis von gebundenen Proteinen auf Nitrocellulosepapier durch Ponceau S Färbung und Markierung durch Antikörper	53
2.3.3.6	Bindung von Calcium-45 an Nitrocellulose-gebundene Proteine (western dot blot)	53
2.3.4	Bioinformatische Methoden	54
2.3.4.1	Benutze Internet-Dienste und Programme	56
2.3.4.2	Modellierung von strukturhomologen Proteinsequenzen	57
2.3.4.3	Bestimmung von Kernstrukturen und Subdomänen von Proteindomänen.....	57
2.3.4.4	Klassifikation der Kernstrukturen durch den Vergleich mit bekannten Strukturen	58
2.3.4.5	Modellierung von nicht strukturhomologen Proteinsequenzen	58
2.3.4.6	Bestimmung und Modellierung der Sekundärstruktur	58
2.3.4.7	Hydrophobe Cluster Analyse (HCA)	58
2.3.4.8	Automatische Modellierung nach einem Sequenzvergleich	59
2.3.4.9	Modellbau von Proteinen mit vollständiger Proteinsequenz.....	59
2.3.4.10	Modellbau von Schleifenregionen	59
2.3.4.11	Konformationsraummodellierung	60
2.3.4.12	Animationen von Konformationsänderungen	60
2.3.4.13	Qualitätsanalyse von Modellstrukturen.....	60
2.3.4.14	Alanin-Scan zur Identifizierung von essentiellen chemischen Oberflächeneigenschaften auf Proteinstrukturen	61
3	Ergebnisse	63
3.1	Modellanalysen von EF Hand Proteinen zur Vorhersage von Konformationsänderungen und neuen Bindungspartnern.....	63
3.1.1	Konformationsraummodell.....	63
3.1.2	Das Neuronale Sensorprotein VILIP-1 durchläuft beim Calcium-abhängigen Myristoylswitch einen Übergangszustand.....	64
3.1.3	Bestimmung von Bindungsstellen für EF Hand Proteine.....	67
3.2	Identifikation und Charakterisierung von Calciumbindungsstellen im transsynaptischen Neurexin/Neurologin Komplex	69
3.2.1	Die EF Hände von Neurologin sind degeneriert und für die Prozessierung aber nicht für die Nrxn-Bindung erforderlich	69
3.2.2	LNS Domänen besitzen eine einheitliche Kernstruktur mit spezifischen elektrostatischen Oberflächenpotentialen und Calciumbindungsstellen	72
3.2.3	Calciumbindet an Neurexin und ist für die Interaktion mit Neurologin essentiell erforderlich	75
3.2.4	Splice-Insertionen sind weder erforderlich noch blockieren sie die Neurexin/Neurologin Komplexbildung	78
3.2.5	Neurologin bindet auch an eine Neurexinmutation mit niedrigster Calciumaffinität	78
3.2.6	Die Neurologinbindung erfolgt über hydrophobe Reste	80
3.2.7	Neurexinbindungstelle von Neurologin - Modellbau und gezielte Mutagenesen an Neurologin zur Findung der Neurexinbindungsstelle	82
3.2.8	Gezielte Mutagenesen zur Überprüfung der Neurexin/Neurologin Modelle	84

3.2.9	Analyse der Mutationen des Neurexin/Neuroigin Komplexes auf Basis der Strukturdaten.....	87
4	Diskussion	92
4.1	Methodenentwicklung.....	92
4.1.1	Grenzen der Modellierung.....	92
4.1.2	Modellierung des Konformationsraums	93
4.1.3	Planung von gezielten Mutagenesen	94
4.2	Neurexin/Neuroigin Komplex.....	94
4.2.1	Agrin, Laminin, und Neurexin bilden eine Untergruppe der LamG/LNS Familie	95
4.2.2	Calciumkoordination	95
4.2.3	Der Transsynaptische Code	97
4.2.4	Kontaktstelle im Neurexin/Neuroigin Komplex	98
5	Ausblick	101
6	Zusammenfassung	102
7	Referenzen.....	104
8	Anhang	117
	Lebenslauf	123

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1-1.	Die EF Hand.....	19
Abb. 1-2.	Transsynaptische calciumabhängige Proteinkomplexe.....	21
Abb. 1-3.	Domänarchitektur von Neurexinen	22
Abb. 1-4.	Methodisches Ablaufschema.....	24
Abb. 1-5.	Modellierung von neuen Proteinen aus bekannten Faltungsfamilien	25

Methoden

Abb. 2-1.	Modellierung von neuen Proteinen aus bekannten Faltungsfamilien	55
-----------	---	----

Ergebnisse

Abb. 3-1.	Kernstrukturen von EF Hand Proteinen.....	63
Abb. 3-2.	Die calciumabhängige serielle Konformationsänderung von VILIP-1 durchläuft einen Übergangszustand.	65
Abb. 3-3.	Alignierung der EF Hände von CaM und Neuroligin 1	69
Abb. 3-4.	Die putativen EF Hände von Neuroligin sind degeneriert und für die Neurexinbindung nicht erforderlich	70
Abb. 3-5.	LNS Domänen haben eine gemeinsame Kernstruktur.	74
Abb. 3-6.	Die Calciumkoordination ist für die Neurexinbindung an Neuroligin essentiell.....	76
Abb. 3-7.	Alternatives Splicing reduziert die Ausbeute an Neurexin/Neuroligin Komplexen, kann deren Bildung hingegen nicht vollständig blockieren	79
Abb. 3-8.	Die Calciumaffinität von Neurexin ist kein entscheidender Faktor für die Neuroliginbindung.....	81
Abb. 3-9.	Neuroligin bindet an hydrophobe Seitenketten von Neurexin.....	82
Abb. 3-10.	Vergleich der Neuroliginmodellstruktur mit den Kristallstrukturen	84
Abb. 3-11.	Neuroligin D271R blockiert die Neurexinbindung.....	86
Abb. 3-12.	Interaktionen im Neurexin/Neuroligin Komplex.	90
Abb. 3-13.	Zusammenfassung der strukturellen Eigenschaften der Neurexin/Neuroligin Kontaktstelle	91

Diskussion

Abb. 4-1.	Transsynaptischer splice-code.....	97
Abb. 4-2.	Hydrophobe Sphäre um das an Neurexin gebundene Calcium.....	99

Anhang

Abb. 8-1.	Erfolgreiche Wiederfindung der Neurexin/Neuroigin Kontaktstelle durch Docking-Verfahren.....	120
Abb. 8-2.	β -Neurexin besitzt gegenüber α -Neurexin zusätzlich 38 Histidin-reiche Reste.....	121
Abb. 8-3.	Oberflächenmarkierung von GFP-Neuroigin exprimierenden Zellen mit löslichen IgG-LNS Domänen und Oberflächensekretion von mutierten Neurexinen.....	122

1 Einleitung

Die neuronale chemische Synapse ist eine strukturell und funktionell hoch komplexe Schnittstelle zwischen Nervenzellen. An ihr werden über Neurotransmitter elektrische Signale vom pre- zum postsynaptischen Terminal übertragen. An der Postsynapse kann die Bindung von Neurotransmitter an exzitatorische Rezeptoren das Signal weiterleiten oder durch Bindung an inhibitorische Rezeptoren beenden. Die an der Erkennung, Ausrichtung und Verknüpfung beider Seiten mitwirkenden Proteine scheinen allerdings auch an einer wechselseitigen Kommunikation zwischen den Neuronen in der Sprache eines "Trans-synaptischen Codes" beteiligt zu sein (Boucard et al., 2005), die zu einer Modifikation des synaptischen Kontakts führen. Die Veränderbarkeit des synaptischen Kontakts bildet die molekulare Grundlage der synaptischen Plastizität und leistet einen wichtigen Beitrag für die kognitiven Fähigkeiten des menschlichen Gehirns (Lamprecht und LeDoux, 2004; Kauer und Malenka, 2007; Neves et al., 2008). Erst kürzlich haben umfangreiche Patientenstudien ergeben, dass genetisch bedingte neurodegenerative und psychiatrische Erkrankungen mit Polymorphismen in Genen synaptischer Proteine korrelieren, wodurch diese als Zielproteine in der pharmakologischen Forschung an Bedeutung gewonnen haben (Chih et al., 2004; Laumonier et al., 2004; Grant et al., 2005; Marino et al., 2007; Szatmari et al., 2007). Während für die an der Signalübertragung beteiligten Rezeptoren und Ionenkanäle bereits natürliche wie künstliche Liganden als Pharmaka genutzt werden (Thorpe et al., 2007), fehlen für deren Entwicklung von den ca. 93% der anderen synaptischen Proteinklassen (Li et al., 2004; Grant et al., 2005; Li et al., 2005; Li et al., 2007) die erforderlichen detaillierten strukturellen Daten. Mehrere Proteinstrukturinitiativen (PSI) haben im Rahmen der Strukturellen Genomanalyse mit *high-throughput (HT)* Methoden bereits bedeutende Details im Zusammenhang von Struktur und Funktion synaptischer Proteine ermitteln können, doch fehlen vor allem die Strukturen der Gesamtproteine, Proteinen mit vollständiger Aminosäuresequenz, und von großen Proteinkomplexen (Fox et al., 2008). Die synaptischen Multidomänproteine können über flexible oder unstrukturierte Teilabschnitte zudem verschiedene Konformationen ausbilden und erschweren dadurch ihre Bestimmung mit den Methoden der Röntgen- oder NMR Strukturanalyse. Für diese Regionen und zur Analyse von dynamischen Gesamtstrukturen gibt es zwar Methoden wie die Röntgenklein- und weitwinkel- (SAXS), sowie die Neutronenstreuung, doch können deren experimentellen Daten ohne modellierte Proteinstrukturen nicht ausgewertet werden (Petoukhov et al., 2002; Svergun und Koch, 2002). Die Modellierung von Proteinstrukturen ist mittlerweile zu einem unverzichtbaren Analyse- und Prognose-Werkzeug auch in der molekularbiologisch orientierten Proteinforschung geworden und dient nicht mehr nur der Erstellung von ansprechenden Fotos auf Titelblättern von Fachzeitschriften. Während sich aber jeder Molekularbiologe aufgrund der sorgsam dokumentierten und gepflegten Methodenprotokolle schnell in eine neue Materie einarbeiten kann, gibt es keine derartigen Protokolle für die Modellstrukturanalyse. Die wenigen verfügbaren kommerziellen Softwarepakete erfüllen zwar alle Aufgaben der Modellstrukturanalyse und bieten Module an, in denen Protokollabläufe erstellt und gespeichert werden können, doch stellen sie hohe Ansprüche an

das IT-Personal und verlangen kostenintensive IT-Ressourcen wie Rechnercluster und diverse Datenbanken. Demgegenüber sind die meisten der in diesen Softwarepaketen enthaltenen Module für Akademiker auch frei verfügbar und werden stetig weiter entwickelt. Zusätzlich werden viele der Programme auch als Web-Anwendung angeboten, so dass der Nutzer hierfür keine eigenen IT-Ressourcen oder Kenntnisse in der Softwareinstallation benötigt. Was fehlt, ist eine effiziente Verknüpfung und Dokumentation dieser Module in einem Protokoll.

Hier sollen Protokolle für die Modellierung von synaptischen Proteinen erstellt werden und diese am Beispiel der großen Familie calciumbindender EF Hand Proteine erprobt werden. Diese Daten sollen dazu dienen, den für den Transsynaptischen Code verantwortlichen Komplex aus Neurexin und Neuroligin strukturell zu charakterisieren, die Calciumbindungs- und Protein-Protein Kontaktstelle im Komplex experimentell zu lokalisieren und den Einfluss von alternativen *splice*-Insertionen aufzuklären.

1.1 Die chemische Synapse als bi-direktionale Kommunikationsschnittstelle zwischen zwei Neuronen

Die chemische Synapse ist die Verknüpfungsstelle zweier Neurone im Nervensystem aller höheren Lebewesen beginnend mit Gewebetieren (Eumetazoa). Die enorme Anzahl an Synapsen (10^{15}) wird für die spezifische Sinnesverarbeitung und die kognitiven Fähigkeiten des menschlichen Gehirns verantwortlich gemacht. Chemische Synapsen dienen hauptsächlich dem Transfer eines elektrischen Ausgangssignals (Aktionspotentials) von der Prä- zur Postsynapse mittels einer zwischengeschalteten Umwandlung in ein chemisches Signal (Neurotransmitter) beschrieben (Dresbach et al., 2003). Die Umwandlung in ein chemisches Signal wird notwendig, da sich zwischen beiden Neuronen ein großer extrazellulärer Zwischenraum (*extracellular cytomatrix*, ECM) von ca. 20 nm befindet (Frotscher et al., 2007), der keine direkte elektrische Übertragung erlaubt. Ein Aktionspotential bewirkt die Exozytose von Neurotransmittern an der axonalen aktiven Zone der präsynaptischen Cytomatrix (*cytomatrix active zone*, CAZ), welche zu ihnen entsprechenden Rezeptoren an der postsynaptischen Dichte (PSD) diffundieren. Die Bindung der Neurotransmitter an die Rezeptoren führt daraufhin entweder zu einer Depolarisation und damit Auslösung eines Aktionspotentials an der postsynaptischen Membran oder zur Hyperpolarisation und Inhibition des Signals. Die Spezifikation der Synapse erfolgt über den Neurotransmitter bindenden Rezeptor und dessen Wirkung an der postsynaptischen Membran. Es werden exzitatorische und inhibitorische Synapsen unterschieden und deren Balance als maßgeblich für die synaptische Signalweiterleitung beschrieben (Hussain und Sheng, 2005). Ein einzelnes Neuron besitzt tausende von Synapsen beider Typs und die exzitatorischen (E) und inhibitorischen (I) Eingangssignale werden im Neuron so verrechnet, dass dieser entsprechend der E/I-Balance im Alles-oder-Nichts-Verfahren ein Ausgangssignal an sein Axon weiterleitet oder nicht.

Bei der Synaptogenese von zwei Neuronen müssen sich passende Prä- und postsynaptische Seiten finden, erkennen und verfestigen. Präsynaptische Terminale, die z.B.

Glutamat ausschütten, müssen postsynaptische Dichten finden in denen Glutamat-Rezeptoren sitzen, damit eine Signalübertragung stattfinden kann. Wie die Suche und die Erkennung stattfindet, ist nicht aufgeklärt. In einem möglichen Szenario könnten Neurotransmitter entlang des Axons als Erkennungsmoleküle ausgeschüttet werden (McAllister, 2007). So wird GABA schon vor der Ausbildung eines synaptischen Kontakts ausgeschüttet (Owens und Kriegstein, 2002) und es konnte die Ausschüttung von Neurotransmittern an anderen Stellen als der Aktiven Zone des Axons (*ectopic release sites*) nachgewiesen werden (Matsui und Jahr, 2003; Coggan et al., 2005), so dass sich in der Umgebung von Axonen bereits eine Fernwirkung auf eine passende PSD einstellen könnte. Andererseits gibt es aber auch Adhäsionsproteine an der CAZ und der PSD, deren ungleiche Verteilung auf exzitatorische und inhibitorische Synapsen eine selektive Erkennung erlaubte (Washbourne et al., 2004; Waites et al., 2005; Shapiro et al., 2007). In heterologen Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Synaptogenese ohne Neurotransmitter und nur durch Expression von Adhäsionsproteinen wie Agrin, Cadherin, Dystroglycan, Ephrin, Laminin, Nektin, Neurexin, Neuroligin, SynCAM u.a. induziert werden kann (Hohenester et al., 1999; Koch et al., 1999; Sugita et al., 2001; Tseng et al., 2003; Graf et al., 2004; Boucard et al., 2005; Hilgenberg et al., 2006; Fogel et al., 2007). Hierbei führten zustandsbedingte Ansammlungen (*cluster*) von Proteinen an der präsynaptischen Seite über feste transsynaptische Verknüpfungen von gleichartigen (homophilen) oder verschiedenen (heterophilen) Adhäsionsproteinen zu entsprechenden Ansammlungen von Proteinen an der postsynaptischen Dichte und umgekehrt (Shapiro et al., 2007). Einige dieser Adhäsionsproteine wie Agrin, Laminin, Neurexine und Neuroligin kommen in verschiedenen *splice*-Varianten vor, welche die Möglichkeiten spezifischer Erkennung enorm potenziert (Missler und Südhof, 1998). Diese Variabilität insbesondere von Neurexinen und Neuroliginen und der Beobachtung, dass nur bestimmte *splice*-Varianten miteinander interagieren können, führte zur Hypothese des "Transsynaptischen *splice*-codes" (Boucard et al., 2005). Dieser beschreibt eine wechselseitige bi-direktionale Kommunikation von Prä- und Postsynapse, die mit der Verwendung von *splice*-Insertionen in Neurexin und Neuroligin kodiert wird (Tabelle 1). Neurexin und Neuroligin könnten nur dann einen Komplex ausbilden, wenn bei der Bindung höchstens eine der für die Bindung relevanten *splice*-Insertionen beteiligt ist. Produziert also eine synaptische Seite *splice*-Insertionen, so wird die synaptische Plastizität bereits geschwächt. Reagiert die andere Seite ebenfalls mit *splice*-Insertionen, so könnte eine vollständige Entkopplung und Dekonstruktion der Synapse folgen. Das Attraktive an diesem Code ist, dass die *splice*-Insertionen erzeugende Seite die "Entscheidungsgewalt", ob der synaptische Kontakt verstärkt oder geschwächt wird, an die andere Seite übergibt. Dabei spielt es keine Rolle ob die prä- oder postsynaptische Seite den Anfang macht. Dies erlaubt einen direkten wechselseitigen Informationsaustausch an der Synapse unabhängig zu aktiven retrograden Prozessen (Alger, 2002) oder rückkoppelnden neuronalen Netzwerken (*neuronal circuits*) (Douglas und Martin, 2004). Zellkulturstudien lassen sogar vermuten, dass dieser Code auch zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen unterscheiden kann. Für die Bestimmung der für die Signalweiterleitung am postsynaptischen Neuron wichtigen Balance von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen werden hiernach Quotienten von Isoform- und

splice-Varianten von Neurexinen und Neuroliginen als Kenngrößen vorgeschlagen (Hussain und Sheng, 2005).

Viele an der synaptischen Signalweiterleitung beteiligten Protein-Protein und Protein-Glykoproteininteraktionen sind calciumabhängig und werden teilweise ausschliesslich durch Änderungen der Calciumkonzentration aktiviert und reguliert. Als wichtige Prozesse seien die Depolarisation der präsynaptischen Membran durch Calciumkanäle (Evans und Zamponi, 2006) und deren Regulation durch calciumbindende Proteine (CaBPs) (Few et al., 2005), die Aktivierung der Fusion von Vesikeln mit der nachfolgenden Ausschüttung von Neurotransmittern (Südhof, 2004), die Bildung transsynaptischer Proteinkomplexe (Nguyen und Südhof, 1997; Hohenester et al., 1999; Koch et al., 1999; Sugita et al., 2001; Tseng et al., 2003; Hilgenberg et al., 2006) und die Signalweiterleitungskaskaden an der Postsynapse genannt (Okabe, 2007; Sheng und Hoogenraad, 2007).

Die meisten der beteiligten calciumbindenden Proteine gehören der Familie der EF Hand Proteine an. In diesen bewirkt Calcium in der Regel eine für das jeweilige Protein charakteristische Konformationsänderung, die für die selektive Bindung an helikale meist endständige Proteinabschnitte verantwortlich ist. Von EF Hand Proteinen wurden über 200 Strukturen gelöst, die einen konservierten Aufbau von doppelten EF Hand Domänen zeigen. Trotz dieser Fülle an strukturellen und experimentellen Daten ist eine Vorhersage der Konformationsänderungen und dem Funktionsspektrums von neu gefundenen EF Hand Proteinen sehr schwierig (Ikura, 1996) und führt immer wieder zu unerwarteten Ergebnissen (Otterbein et al., 2002; Yamauchi et al., 2003). Neuroligin, das mit Neurexin an der Erkennung und Selektion der Prä- und postsynaptischen Seite verantwortlich gemacht wird, wurde ebenfalls als ein EF Hand Protein vorgeschlagen (Tsigelny et al., 2000).

1.2 EF Hand Proteine sind prototypische Calciumbindungsproteine

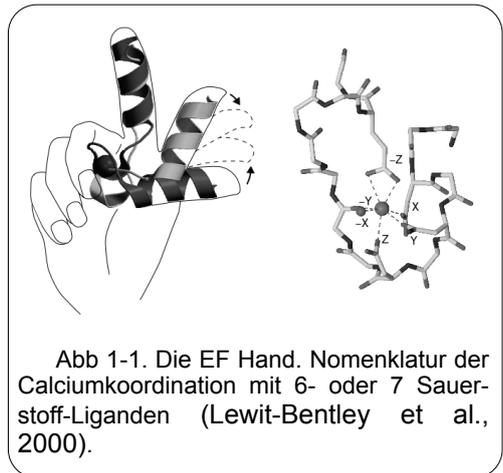
Die Bezeichnung EF-Hand wurde vor 30 Jahren von R. H. Kretsinger für ein Calciumbindendes Helix-Schleife-Helix Strukturmotif eingeführt, in der die Buchstaben E und F Helices in der Parvalbuminstruktur kennzeichneten (Kretsinger et al., 1972). Diese artifizielle Bezeichnung gilt heute für weit über 3000 calciumbindende Proteine (Grabarek, 2006). Es existieren bereits über 200 Strukturen in der Proteindatenbank (PDB, <http://www.rcsb.org>), die eine leichte Zuordnung von neuen Proteinsequenzen in diese Familie ermöglichen. Diese Proteinfamilie zeichnet sich besonders durch eine schwer vorhersagbare Wirkung der Calciumbindung auf die Wahl der Bindungspartner, die Konformationsänderungen und die Art der Informationsübertragung aus. So binden die strukturell ähnlichen EF Hand Domänen von Calmodulin (CaM), Vilip und Caldendrin (Synonym: calciumbindendes Protein 1, CaBP1) dieselbe Bindungsstelle am Calciumkanal CaV2.1, verursachen jedoch gegenteilige Reaktionen (Few et al., 2005; Lautermilch et al., 2005; Mori et al., 2008). Das lässt sich mit einer monokausalen Beziehung nicht erklären, in dem die Bindungsstelle am CaV2.1 als Schalter für eine Funktion dient. Vielmehr scheint die Art und Weise wie EF Hände den Schalter betätigen, ebenfalls eine Rolle zu spielen, so bewirkt Calcium in allen drei Proteinen eine unterschiedliche Konformationsänderung (Cox et al., 1994; Mikhaylova et al., 2006;

Gsponer et al., 2008). Entsprechend ihrer Reaktionsfähigkeit auf Änderungen in der Calciumkonzentration werden die EF Hand Proteine als Sensoren, Regulatoren oder Puffer bzw. Transporter bezeichnet. Sensoren wie Vilip oder Recoverin vollführen in der Regel schon bei einer sehr geringen Calciumkonzentration (< 100 nM) eine komplexe Konformationsänderung durch, wodurch sich ihr Spektrum an Bindungspartnern gravierend ändern kann, während Regulatoren wie CaM Calcium fast ausschliesslich für die Bindung oder Nicht-Bindung von strukturell ähnlichen Partnern

benötigen. Die herausragendste Struktur eines Regulators zeigt die Bindung der CaM-ähnlichen regulatorischen Domäne (RD) an Myosin (Houdusse und Cohen, 1996). In einem einzigen Kristall banden Sequenz-identische Hantelhälften (*dumb bells*) bestehend aus zwei EF Händen der RD in calcium-gebundener wie auch calcium-freier Form an verschiedene Regionen der helikalen Myosinkette. Da die Calciumkonzentration im Kristall konstant war, hat hier der Peptidligand (Myosin) die Art der Bindung und die Konformation des EF Hand Proteins bestimmt (Houdusse und Cohen, 1995, 1996).

Die Puffer oder Transporter binden Calcium, scheinen aber keine weitere Funktion zu haben, so dass sie sich wie Parvalbumin dazu eignen die freie hydratisierte Calciumkonzentration niedrig zu halten und Calcium in andere Regionen der Zelle oder z.B. über das Blut in andere Körperregionen zu transportieren. Die Puffer verhindern eine mögliche Präzipitation von schwerlöslichem anorganischen Calciumphosphat oder Calciumoxalat. Während intrazellulär Proteine diese Aufgabe übernehmen, so können es extrazellulär zusätzlich sulfatierte Glykosaminoglykane oder Phospholipide tun.

Die am häufigsten (*canonical*) vorkommende EF-Hand wird aus 12 Resten gebildet, die mit einem Aspartat beginnen und mit einem Glutamat enden (Grabarek, 2006). In der typischen oktaedrischen Anordnung werden die Positionen der calciumkoordinierenden Sauerstoffatome mit orthogonalen Richtungsvektoren x , y , z , $-x$, $-y$, und $-z$ bezeichnet (Abb. 1-1). In den meisten EF Hand Proteinen gibt es allerdings einen siebten Koordinator in Form eines Glutamat in der letzten Position ($-z$), welcher mit seinen beiden Carboxylatsauerstoffen Calcium ligiert (*bidentate ligand*) und die oktaedrische Geometrie zu einer pentagonalen Bipyramide erweitert. Weiterhin bindet in allen EF Hand Strukturen an der $-y$ Position ein Hauptketten Carbonylsauerstoff, während die anderen Positionen nicht konserviert besetzt sind. So besitzt Calbindin D9k 14 Reste in einer seiner EF-Schleifen und das endständige Glutamat bildet die einzige Seitenkettenverbindung (Szebenyi und Moffat, 1986). Dort sind alle anderen Calciumliganden Carbonylsauerstoffe der Hauptkette, obgleich drei saure Seitenketten in der Schleife für eine Calciumkoordination vorhanden wären. In manchen EF Hand Proteinen kann eine EF Hand Schleife kein Ion binden, da die Schleife entweder zu kurz ist (z.B. Herz TnC (Takeda et al., 2003)) oder Mutationen trägt (z.B. Caldendrin, Parvalbumin, Vilip (Kretsinger et al., 1972; Cox et al., 1994; Seidenbecher et al., 1998)). In



Parvalbumin hat auch eine Substitution der inaktiven Schleife mit einer *canonischen* 12 Reste langen Schleife, die Calciumbindung nicht wiederhergestellt (Kretsinger et al., 1972). Grund hierfür ist, dass die Geometrie zwischen den Helices E und F, sowie der hydrophobe Kontakt zwischen den beiden EF Händen mitentscheidend für die Ausbildung einer calciumkoordinierenden Schleifenkonformation ist, so dass als Spezifikation für eine EF Hand auch der Winkel zwischen E und F angegeben wird (*vector geometry mapping*, VGM, <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/vgm/> und (Grabarek, 2006)).

Während EF Hände in Proteinen relativ gut identifizierbar sind, so stellt die Findung von Bindungsstellen selbst von experimentell nachgewiesenen Interaktionspartnern eine Herausforderung dar. Auf Basis bisher gelöster EF Hand/Peptid Komplexe wurden Sequenzmotive definiert und in einer Datenbank abgelegt (*CaM target database*, <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>). Diese Motive beschreiben fast ausnahmslos die Positionen von hydrophoben Resten auf dem helikalen Peptidabschnitt, welches von einer oder beiden doppelten EF Hand Domänen gebunden wird. Zusätzlich weist der Peptidligand eine nicht-konservierte dichte Anordnung von basischen Resten auf, die der eigentlichen Bindungsstelle vor- oder nachgeschaltet ist. Mit der RD/Myosin Struktur wurde das IQ Motiv charakterisiert (Houdusse und Cohen, 1996) und seitdem für die Ausbildung einer Calcium-unabhängigen Bindung verantwortlich gemacht (Rhoads und Friedberg, 1997). Jacob, ein strukturell und funktionell nicht charakterisiertes Protein, wurde als Calcium-abhängiger Bindungspartner von Caldendrin experimentell identifiziert (Dieterich et al., 2008). Auch in Jacob befindet sich eine IQ Sequenzabfolge, die allerdings nicht der PROSITE Spezifikation (IqxxxRGxxxR, prosite entry: PDOC50096) eines IQ Motivs entspricht und auch nicht von der *CaM target database* als EF Hand bindendes Protein identifiziert wird (letzter Test: 9.6.2008). Mit Hilfe von Modellierungsverfahren sollte in dieser Arbeit die Caldendrin Bindungsstelle auf Jacob gefunden werden.

Aufgrund der geringen Sequenzidentität von EF Hand Schleifen und deren Variationen in der Calciumkoordination wird deutlich wie unzuverlässig es ist, aus einem Sequenzalignment die Ionenpräferenz (Calcium, Magnesium, Strontium, Mangan oder Lanthanoide), den Effekt von Punktmutationen oder die Calcium-induzierten Konformationsänderungen abzuleiten (Ikura, 1996). Noch schwieriger ist es, die EF Hand Schleifen in Proteinsequenzen zu entdecken, die keine Homologie zur CaM-Familie aufweisen. Hierzu zählen die Cholinesterase-ähnlichen Adhäsionsmoleküle (CAMs), einschliesslich Neuroligin, für die eine doppelte EF Hand Struktureinheit nur durch ein bioinformatisches Hidden-Markov-Modell Verfahren prognostiziert werden konnte (Tsigelny et al., 2000). Anhand der vergleichenden Analyse des Konformationsraums von EF Hand Proteinen wie Vilip und Caldendrin, wie auch der Modellierung derer Peptidkomplexe sollte ein Referenzmodell geschaffen und Methoden zusammengestellt werden, welche die Modellierung des Neurexin/Neuroligin Komplexes erlauben sollte.

darstellt (Pardo und Eberhart, 2007; Abrahams und Geschwind, 2008), so sind Neurexin und Neuroligin das einzige ASD-korrelierte Proteinpaar, das einen transsynaptischen Komplex ausbildet und dessen umfangreiche und selektiv wirkende Formenvielfalt genügend pharmakologische Ansätze bietet.

Von Neurexin und Neuroligin gibt es jeweils bis zu sechs verschiedene Isoformen, die zusätzlich an bis zu fünf Stellen alternative *splice*-Insertionen enthalten können (Abb. 1-3). In Summa ergeben sich dadurch weit über 1000 Kombinationsmöglichkeiten allein für Neurexine (Ullrich et al.,

1995; Missler und Südhof, 1998). Es war schon früh beobachtet worden, dass nur bestimmte *splice*-Kombinationen eine Komplexbildung erlauben. So galt es lange Zeit, dass nur β -Neurexin ohne *splice*-Insert #4 (-SS4) in der Lage sei, Neuroligin aus Hirnlysaten zu binden, während für α -Neurexin überhaupt keine Bindung gezeigt werden konnte (Nguyen und Südhof, 1997). β -Neurexin ist bis auf wenige zusätzliche Reste identisch zum C-Terminus α -Neurexin, beginnend von der sechsten Lamin-Neurexin-Sexhormon-bindendes-Protein (LNS) Domäne (Abb. 1-3). α - und β -Neurexin werden vom selben Gen kodiert, welches von zwei unabhängigen Promotern

gesteuert wird. Dadurch besitzt β -Neurexin ein anderes Signalpeptid und 38 zusätzliche Histidin-reiche N-terminale Reste. Diesen zusätzlichen Resten wurde es zugeschrieben, dass nur β -Neurexin in der Lage sei, Neuroligin zu binden (Nguyen und Südhof, 1997; Boucard et al., 2005). Erst vor wenigen Jahren

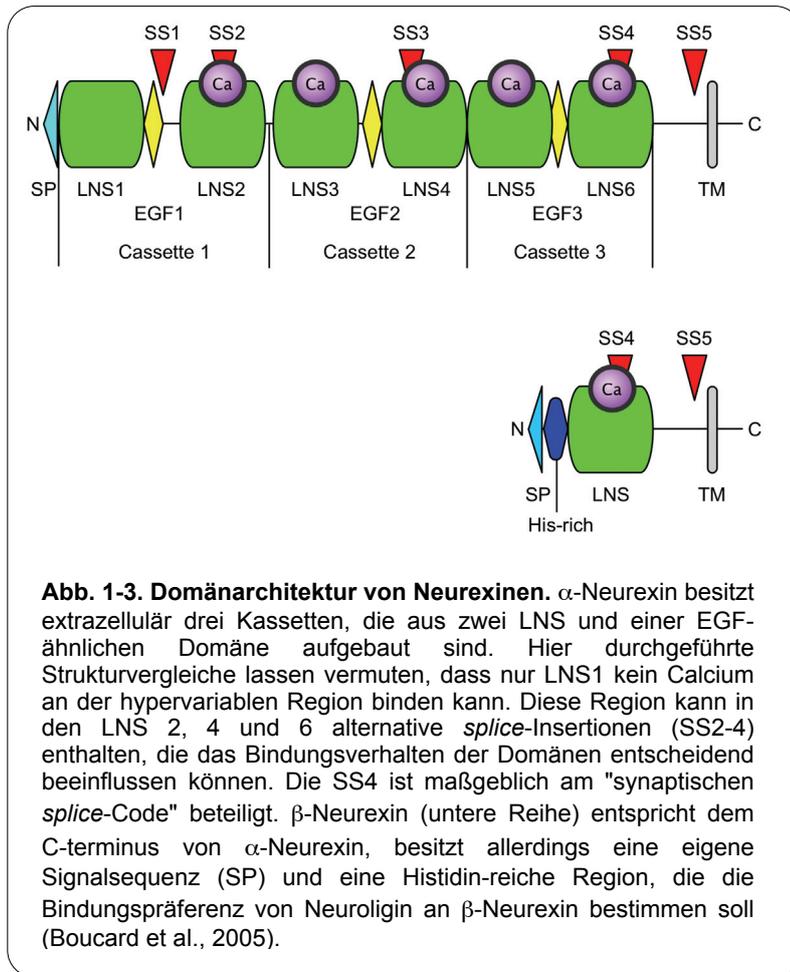


Abb. 1-3. Domänenarchitektur von Neurexinen. α -Neurexin besitzt extrazellulär drei Kassetten, die aus zwei LNS und einer EGF-ähnlichen Domäne aufgebaut sind. Hier durchgeführte Strukturvergleiche lassen vermuten, dass nur LNS1 kein Calcium an der hypervariablen Region binden kann. Diese Region kann in den LNS 2, 4 und 6 alternative *splice*-Insertionen (SS2-4) enthalten, die das Bindungsverhalten der Domänen entscheidend beeinflussen können. Die SS4 ist maßgeblich am "synaptischen *splice*-Code" beteiligt. β -Neurexin (untere Reihe) entspricht dem C-terminus von α -Neurexin, besitzt allerdings eine eigene Signalsequenz (SP) und eine Histidin-reiche Region, die die Bindungspräferenz von Neuroligin an β -Neurexin bestimmen soll (Boucard et al., 2005).

Tabelle 1-1. Transsynaptischer Code von Neurexin (Nrxn) und Neuroligin (Nlgn). Nur eine bestimmte Kombinationen von *splice*-Isoformen (Nrxn \pm SS4 und Nlgn \pm B) binden (+) einander oder nicht (-). α -Nrxn+SS4 zeigt eine spezifische Präferenz für Nlgn-2, während keine der Isoformen bei Anwesenheit beider *splice*-Insertionen (+SS4, +B) bindet.

		Nlgn-1		Nlgn-2
		-B	+B	-B
α -Nrxn	- SS4	+	-	+
	+ SS4	+	-	+
β -Nrxn	- SS4	+	+	+
	+ SS4	+	-	+

konnte eine Neuroliginbindung für Neurexin 1 α und 2 α gezeigt werden, wobei neben der zu β -Neurexin identischen α LNS6 Domäne auch eine kurze Region der dritten Epidermiswachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (α EGF3) für die Bindung erforderlich sei (Boucard et al., 2005).

Aufgrund der ungleichen Bindungspräferenzen von *splice*-Insertionen tragenden α - und β -Neurexinen wurde der transsynaptische *splice*-Code abgeleitet (Tabelle 1-1): besitzt einer der beiden Interaktionspartner β -Neurexin oder Neuroligin keine *splice*-Insertion (-B oder -SS4), so wird ein Komplex gebildet, unabhängig davon, ob der andere Partner eine *splice*-Insertion trägt oder nicht. Trägt hingegen Neuroligin die *splice*-Insertion B, so ergibt sich ein differenzierteres Bindungsmuster. Interessanterweise band α -Neurexin als Gesamtprotein nur Neuroligine ohne *splice*-Insertion B (Boucard et al., 2005). Da Neuroligin-2 ausschliesslich ohne *splice*-Insertionen vorkommt ist die Bindung an dieses Protein bevorzugt und α -Neurexin und Neuroligin-2 gelten als Induktoren für die Reifung inhibitorischer Synapsen (Chih et al., 2006; Kang et al., 2008).

Mit der Entdeckung des Neurexin/Neuroligin Komplex war auch die Calciumabhängigkeit untersucht worden und eine Calciumbindung für Neuroligin, aber keine für β -Neurexin gezeigt worden (Nguyen und Südhof, 1997). Auch die später gelöste Kristallstruktur von β -Neurexin hatte kein Calcium gebunden (Rudenko et al., 1999). Die Neuroliginsequenz gehört zur Familie der CAMs und besitzt zwei EF Hand-ähnliche Motive (Tsigelny et al., 2000). Demnach ist Neuroligin neben dem Knochenmarkspolypeptid BM-40 (Pottgiesser et al., 1994) das zweite EF Hand Protein in der ECM. BM-40 verhält sich wie ein Calciumpuffer. Der Neurexin/Neuroligin Komplex sollte wie BM-40 bei der für die ECM als nahezu konstant angenommenen Calciumkonzentration von 2 mM mit Calcium gesättigt sein und seine Bildung auch durch eine 100-fache lokale Erniedrigung der Calciumkonzentration nicht beeinträchtigt sein, da er bereits bei einer $[Ca^{2+}]$ von unter 10 μ M gebildet wird (Nguyen und Südhof, 1997). Neuroligin hat die *canonical* 12 Reste lange EF-Hand Schleife, endet aber nicht auf ein *bidentate* Glutamat, sondern auf Aspartat, wodurch der siebte Sauerstoffligand fehlt und wie bei der Myosin bindenden Regulatorischen Domäne eine Bindungspräferenz für Magnesium zur Folge haben könnte (Yang et al., 2002). Neuroligin scheint letzterem nicht zu entsprechen, da der Neurexin/Neuroligin Komplex mit Magnesium nicht gebildet werden konnte (Nguyen und Südhof, 1997).

Zur Identifizierung der Kontaktflächen im Neurexin/Neuroligin Komplex und der Calciumbindungsstellen wurden bereits einige Studien unter Anwendung von gezielten Mutagenesen durchgeführt (Comoletti et al., 2003; Hoffman et al., 2004). Hiernach wird die Komplexbildung durch die Anwesenheit von Glykosylierungen und den *splice*-Insertionen beeinflusst, so dass die Kontaktfläche auf beiden Proteinen in der Nähe der jeweiligen *splice*-Insertionen angenommen wird (Dean und Dresbach, 2006). Mit Hilfe des molekularen Modellbaus sollte in dieser Arbeit eine Struktur von Neuroligin auf Basis der Koordinaten der Acetylcholinesterase (Harel et al., 1995) und mehrere Komplexstrukturen zusammen mit der Neurexin 1 β LNS Domäne (Rudenko et al., 1999) erstellt werden. Die Komplexe sollten allen bekannten experimentellen Daten genügen und durch weitere gezielte Mutagenesen überprüft werden (Abb. 1-4).

1.4 Modellbau und Funktionsanalyse von Proteinen unbekannter Struktur

Die Modellierung von Proteinstrukturen ist *ab initio*, auf rein physikalischen und chemischen Parametern beruhend, nur für kurzkettige Peptide möglich (Banavar und Maritan, 2007). Wie die Aminosäuresequenz des Proteins und zelluläre Faktoren (z.B. Chaperone, Signalerkennungspoteine) die Faltung einer Proteins bestimmen, ist nicht hinreichend bekannt als dass sich eine Proteinstruktur allein aus seiner Sequenz auf Basis eines "Strukturellen Codes" ableiten ließe. Es wird angenommen, dass es nicht viel mehr als 1000 verschiedene Faltungseinheiten gibt aus denen Proteine aufgebaut sind (Dill et al., 2008). Aus diesem Grund haben sich die Proteinstrukturinitiativen mit dem Ziel gegründet, das Spektrum an unterschiedlichen

Proteindomänfamilien experimentell mit den Methoden des NMR und der Kristallographie zu bestimmen. Trotz großer technischer und wissenschaftlicher Erfolge ist die experimentelle Strukturbestimmung noch weit davon entfernt so kalkulierbar und schnell durchführbar zu sein wie z.B. die Analyse des Genoms eines einzelnen Menschen

(Wheeler et al., 2008). Es ist auch noch nicht absehbar, wann alle unterschiedlichen Faltungseinheiten identifiziert sind (Fox, 2008). Dennoch erlauben die bereits gefundenen Faltungseinheiten eine relativ einfache Modellierung von den Proteinen, deren Sequenzen zu mindestens 20% mit denen der Faltungseinheit identisch sind. Solche Modellstrukturen werden auch automatisch erstellt und sind in verschiedenen Datenbanken wie der *SwissModel Repository* (Guex und Peitsch, 1997), der *Protein Model Database* (PMDb, (Castrignano et al., 2006)) oder der *Database of Comparative Protein Structure Models* (ModBase, (Pieper et al., 2006)) abrufbar. In der Regel sind diese Modelstrukturen meist einzelne und unvollständige Proteindomänen, die noch um Schleifenregionen, sowie den N- und C-Termini ergänzt werden müssen. Von den wenigen Programmen, die für die Modellierung von Proteinstrukturen konzipiert wurden, wurde hier der *SwissPDB Viewer* (Guex und Peitsch, 1997) eingesetzt, da er für die gängigen Betriebssysteme von Microsoft, Apple und für Unix

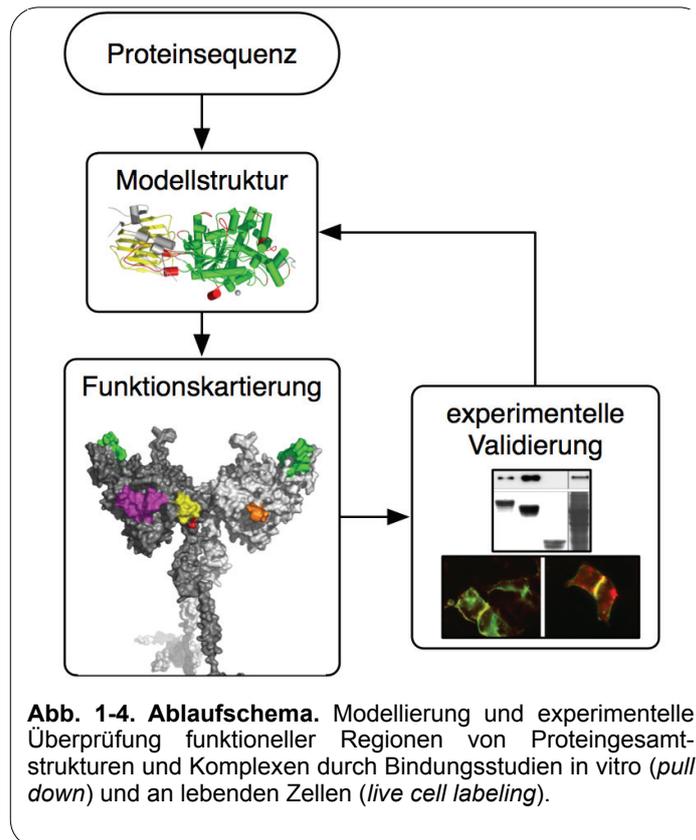


Abb. 1-4. Ablaufschema. Modellierung und experimentelle Überprüfung funktioneller Regionen von Proteingesamtstrukturen und Komplexen durch Bindungsstudien *in vitro* (*pull down*) und an lebenden Zellen (*live cell labeling*).

verfügbar ist, keine nennenswerten Ansprüche an die Hardware stellt und alle erforderlichen Werkzeuge für die Modellierung von Gesamtproteinen bietet. Das übliche Protokoll einer Strukturmodellierung beginnt mit Anwendung eines NCBI-BLAST zur Suche nach einer geeigneten Referenzstruktur für Sequenzabschnitte, die einer bekannten Faltungsfamilie oder Proteindomäne zuzuordnen sind (Abb. 1-5). Die erhaltenen Referenzstrukturen können im SwissPDB Viewer direkt von der Proteindatenbank (PDB) geladen und die Fragmente entsprechend der Sequenzalignierung aus dem BLAST-Ergebnis modelliert werden. Die fehlenden Abschnitte (N- und C-Termini, Schleifenregionen) können entweder über SwissModel (Guex und Peitsch, 1997) oder manuell eingefügt werden. Da die meisten Bindungsstudien mit isolierten Domänen durchgeführt werden, können bereits auf diesen unvollständigen Modellstrukturen experimentelle Daten als individueller Farbcode auf der Proteinoberfläche mit Pymol (DeLano, 2002) kartiert werden. Diese Modelle bieten teilweise schon eine ausreichende Basis für die Planung neuer Experimente. Auf diese Weise sollen hier die CAM Domäne von Neurologin auf Basis der Acetylcholinesterasestrukturen und dessen doppelte EF Hand auf Basis von CaM modelliert werden.

Die Modellierung von Sequenzabschnitten, die keine Homologie zu bekannten Faltungseinheiten aufweisen, ist relativ unsicher und unterliegt nur wenigen Qualitätskriterien. In diesem Fall bestimmt die Fragestellung die Auflösungsgrenze und Güte des Modells wie bei der Betrachtung der rigiden LNS und der CAM Domäne von Neurexin und Neurologin, die beide eine zu geringe Ausdehnung haben, um als Komplex den

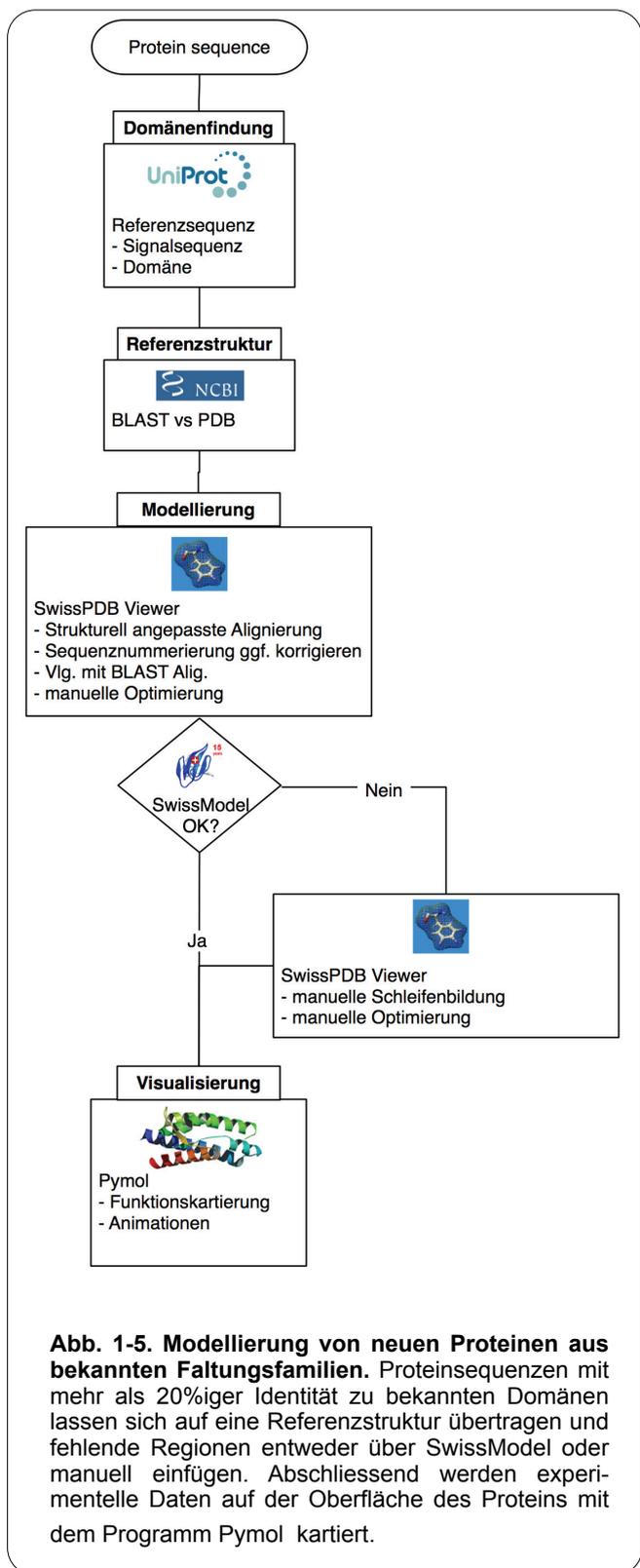


Abb. 1-5. Modellierung von neuen Proteinen aus bekannten Faltungsfamilien. Proteinsequenzen mit mehr als 20%iger Identität zu bekannten Domänen lassen sich auf eine Referenzstruktur übertragen und fehlende Regionen entweder über SwissModel oder manuell einfügen. Abschliessend werden experimentelle Daten auf der Oberfläche des Proteins mit dem Programm Pymol kartiert.

synaptischen Spalt zu überbrücken (Fairless et al., 2006; Craig et al., 2007). Die stark glykosylierten Regionen zwischen den jeweiligen Domänen und Transmembranregionen müssen für eine Komplexbildung eine Gesamtlänge von mindestens 10 Å aufweisen. Die Kenntniss einer exakten Struktur dieser Region ist für die aktuelle Fragestellung zur Kontaktstelle innerhalb des Neurexin/Neuroigin Komplexes nicht erforderlich, so dass für eine Modellierung dieser Region nur die Sekundärstrukturelemente mittels PsiPred (Jones et al., 1999) bestimmt und diese nur so zusammengesetzt werden müssen, dass die gewünschte Ausdehnung erreicht wird. Als Gütekriterium dient bei dieser Modellierung ein Ramachandran-Diagramm.

Für die Vorhersage von Konformationsänderungen in Proteinstrukturen gibt es derzeit wenig Anhaltspunkte, wenn nicht explizit experimentelle Daten wie von SAXS Messungen vorliegen (Tsutakawa et al., 2007). So ist es ohne Kenntnis der Anfangs- und Endstruktur mit den gegenwärtigen bioinformatischen Methoden wie Normal-Mode-Verfahren (Suhre et al., 2004) nicht möglich vorherzusagen, ob ein EF Hand Protein eine komplexe Konformationsänderung wie den Myristoyl-Switch durchführt oder nur die Konformation der zentralen Helix verändert wie CaM. Für einen neuen Ansatz in der Analyse von EF Hand Proteinen und für die nachfolgende Strukturvorhersage von Neuroigin soll ein Konformationsraummodell entworfen werden, welches für eine beliebige EF Hand Proteinsequenz jede bekannte Konformation einer EF Hand Struktur darstellen kann und hierüber einen direkten Vergleich zwischen Calcium-Sensoren, -Regulatoren oder -Puffern ermöglichen soll.

Als Qualitätsanalyse einer Modellstruktur können experimentelle Daten auf der Strukturoberfläche kartiert und ggf. weitere gezielte Mutagenesen geplant werden (Abb. 1-5). Die Art und Weise der Kartierung kann frei gewählt werden, wobei sich eine Kodierung in den Regenbogenfarben von blau (funktionslos, unveränderte Struktur) nach rot (essentieller funktioneller Bereich, Modell entspricht nicht der Referenzstruktur) anbietet. Zusätzlich kann der Einfluss eines beliebigen Restes innerhalb der Struktur oder an der Kontaktstelle in einem Proteinkomplex durch theoretische Bindungsenergieberechnungen bestimmt und die Proteinoberfläche entsprechend zur Analyse kartiert werden. Die Grundlage der Berechnung bilden empirisch ermittelte Bibliotheken von Kraftfeldern wie die FOLDEF Bibliothek, welche vom Programm FoldX genutzt werden (Guerois et al., 2002). Auf Basis dieser Kraftfelder lassen sich die freie Gibbs-Energie (ΔG) und die partiellen Energieterme (z.B. von polaren, hydrophoben oder vanderWaals Wechselwirkungen) berechnen, mit denen ein Aminosäurerest in Wechselwirkung mit der Struktur steht. Gegenwärtig sind Bindungsenergieberechnungen nur von statischen Strukturen reproduzierbar, während eine Vorhersage der Bindungsspezifitäten und der Einfluss von einzelnen Resten einer sich stark verändernden Bindungstasche große Rechenkapazitäten wie verteilte Computernetzwerke (z.B. Proteins@Home, Docking@Home) erfordert. Beim Protein@Home Projekt werden für eine gegebene Faltung alle möglichen Aminosäuremutationen durchgeführt, die Proteininstabilität als ΔG berechnet und die "stabilen Sequenzen" in einer Datenbank gespeichert. Im Ergebnis können neue Proteinsequenzen über einen BLAST mit diesen theoretischen Sequenzen verglichen und einer Faltung zugeordnet werden (*inverse protein*

folding). Zusätzlich werden komplexe Sequenzsignaturen erhalten, die für diese Faltung essentiell sind und Hinweise auf den Strukturellen Code liefern können. Ein weniger aufwendiges Verfahren stellt der Alanin-Scan dar, bei dem einige ausgewählte Reste zu Alanin mutiert werden und deren Einfluss auf die Faltung- oder Komplexstabilität experimentell oder theoretisch über ΔG Berechnungen bestimmt werden. Alaninmutationen von Resten, die die Komplexbildung verhindern, markieren diese als *hot spots* (Moreira et al., 2007; DeLano et al., 2002). Stabile und durch gezielte Mutationen kaum zu beeinflussende Protein-Protein Interaktionen basieren auf Hauptkettenbindungen in denen die Seitenketten nur einen moderaten Einfluss auf die Bindungsaffinität haben wie z.B. bei der β - β Interaktion in PDZ/Peptid Komplexen (Remaut et al., 2006). Bindungsepitope, die hauptsächlich über die Hauptkette interagieren, besitzen, aufgrund der hohen Toleranz in der Proteinsequenz, viele Bindungspartner und werden als "promisk" bezeichnet (z.B. PDZ und SH3 Domänen). EF Hand Proteine, die als anderes Extrem fast ausschließlich über Seitenketten interagieren, sind ebenfalls promisk, da sich die Bindungstasche den unterschiedlichen Aminosäuresequenzen im helikalen Peptid durch Konformationsänderungen anpassen kann (Yamniuk et al., 2004). Die Promiskuität wird als evolutioneller Vorteil und Übergangszustand in der Reifung von Bindungsstellen gewertet (Aharoni et al., 2005). Entsprechend ist die Interaktion von Neurexin zu Neuroligin ausgereift und hoch-spezifisch, da das LNS/CAM Bindungspaar nicht durch homologe Domänen wie von Agrin oder der Acetylcholinesterase ausgetauscht werden können (Comoletti et al., 2003). In dieser Arbeit sollen *hot spot* Reste auf einer oder beider Proteine Oberflächen gefunden werden, die die Spezifität des Neurexin/Neuroligin Komplexes und seiner Isoformen kennzeichnen.

1.5 Zielsetzung

Für die Modellstrukturanalyse sollten in dieser Arbeit Protokolle erstellt werden, die frei verfügbare Programme und Web-Applikationen effizient einsetzen. Diese Protokolle sollten nachfolgend für die Modellierung von synaptischen Proteinen und Proteinkomplexen angewandt werden, die an der bi-direktionalen Kommunikation zwischen der Prä- und Postsynapse beteiligt sind. Viele dieser Proteine binden Calcium bzw. benötigen es für Protein-Protein Interaktionen, aber deren Calciumbindungsstellen und auch deren Calcium-abhängigen Konformationsänderungen sind noch weitestgehend ungeklärt. Zur Analyse der Konformationsänderungen der am häufigsten an der Synapse vorkommenden Calcium-bindenden Proteinen wie den neuronalen EF Hand Proteinen, einschliesslich der Cholinesterase-ähnlichen Adhäsionsproteine (CAMs) und der Lektin-ähnlichen Lamin-Neurxin-Sexhormonbindungsprotein (LNS)-Domäne Proteine sollte ein Konformationsraummodell entworfen werden. Dieses Modell sollte einen vollständigen Datensatz aller möglichen Konformere einer Proteindomäne oder eines Gesamtproteins auf Basis bekannter Proteinstrukturen enthalten und eine Simulation der internen Bewegungsabläufe (*protein motions*) erlauben. Die so erhaltenen Protokolle und Informationen sollten zur Modellanalyse des für die bi-direktionale Kommunikation wichtigen transsynaptischen Komplex von Neurexin und Neuroligin genutzt werden. Die Interaktion beider Proteine erfolgt Calcium-abhängig über deren LNS (Neurexin) und EF Hand-ähnlichen CAM Domäne (Neuroligin). Da für beide Proteine weder die Calciumbindungsstelle noch die Kontaktflächen im Proteinkomplex bekannt sind, sollten diese anhand des Konformationsraummodells modelliert werden. Nachfolgend sollten die Neurexin/Neuroligin Komplexmodelle durch gezielte Mutagenesen experimentell überprüft werden. Im wechselseitigen Abgleich von Modell und Bindungsstudien sollte geprüft werden, (i) ob Neuroligin ein EF Hand Protein ist, (ii) welche Reste zur Kontaktfläche im Neurexin/Neuroligin Komplex gehören und (iii) welchen Einfluss *splice*-Insertionen in Neurexin und Neuroligin auf die Komplexbildung haben.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
AMBA	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalolpropionat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Cholinesterase-ähnliche Adhäsionsmolekül
CaM	Calmodulin
CASK	calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CAZ	Cytomatrix an der aktiven Zone
CAZ	Cytomatrix Aktive Zone
cDNA	<i>copy</i> -DNA
cGMP	cyclisches Guanidin-3',5'-monophosphat
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus-Promoter
DDW	Doppelt destilliertes Wasser oder entsprechend hochreines Wasser
DMEM	Dulbelcos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFP	Verstärktes grün fluoreszierendes Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GTP	Guanidin-5'-triphosphat
GuK	Guanylatkinase-ähnliche Domäne
h	Stunde
HEK	human embryonic kidney
HEPES	2-[-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	<i>Luria Bertani</i>
LNS	<i>Laminin-Neurexin-Sexhormonbindendesprotein, Laminin-G Domäne</i>
M	Mol/Liter
MAGuK	Membranassoziertes Guanylatkinase-ähnliches Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	Modified Eagles Medium
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nrxn	Neurxine

NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDZ	postsynaptic density-95/Discs large/zona occludens-1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	postsynaptische Dichte
R.M.S.D.	Root mean square deviation
RNA	Ribonukleinsäure
RT	<i>Raumtemperatur</i>
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH3	Src homology
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TBS	tris-buffered saline
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
V	Volt
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklave	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Blotapparaturen	BioRad, München
Digitalwaagen	Sartorius, Göttingen
DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Eismaschine	Scotsman, Venon Hills, USA
Elektroporator	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2)	Carl Zeiss, Jena
Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen
Geltrockner	BioRad, München
Heizblock	Unitek, Lautenbach
Inkubator (LB-Platten)	WTB-Binder, Tuttlingen
Inkubator/ Brutschrank	Sanyo, Gunma, Japan
Inkubatorsschüttelhaube	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlschränke	Sanyo, Gunma, Japan
Kühlzentrifuge (5810R)	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss, Jena
Ligationskammer	Techne, Cambridge, UK
Magnetrührplatten	Heidolph, Kelheim; H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
PCR-Maschine	WTW-inoLab, Weilheim
pH-Meter	Biometra, Göttingen
Pinzette	Dumont & Fils, Montignez, Schweiz
Schüttler	GFL, Burgwedel; Heidolph, Kelheim
Spektrophotometer	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometriküvetten	Brand, Wertheim/Main
Sterilisationsofen	Memmert, Schwabach
Sterilwerkbank	Kendro (Thermo Sci., Waltham, USA)
Sterilwerkbank	Hereaus, Hanau
Strahlenmessgerät	Berthold Tech., Bad Wildbad
Tiefkühlschrank	Sanyo, Gunma, Japan
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Kendro, Asheville, USA
Ultrazentrifugen	Sorvall (Thermo Sci., Waltham, USA); Beckmann, Krefeld
Vortexer	IKA, Wilmington, USA
Wasserbad	Julabo, Seelbach; Lauda, Lauda-Königshofen

2.2.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Groningen
AMBA	Roche, Mannheim
Ammoniumacetat	Sigma, Taufkirchen
AP	Roche, Mannheim
APS	BioRad, Hercules, München
ATP	Roche, Mannheim
b-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
BSA	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Calcium-45, 1mCi	Perkin-Elmer, Rodgau - Jügesheim
Chloroform	Roth, Thüringen
Coomassie	VWR, Darmstadt
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Di-Ammoniumsulfat	Sigma, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat	VWR, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Roche, Mannheim
DMF	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DNA Molecular Weight Marker X	Roche, Mannheim
DNA-Längenmarker	Invitrogen, Groningen
DNase	Sigma, Taufkirchen
dNTP's	Roche, Mannheim
ECL-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EDTA	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EGTA	Roche, Mannheim
Entwickler	Tetenal, Norderstedt
Essigsäure 100%	VWR, Darmstadt
Ethanol	Calbiochem, San Diego
Ether	Roth, Thüringen
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
FBS	Invitrogen, Groningen
Formamid	Calbiochem, San Diego
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Glukose	Sigma, Taufkirchen
Glutaraldehyd	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IGEPAL CA-630, NP-40	Sigma, Taufkirchen
Imidazol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPTG	Roche, Mannheim
Isopropanol	ICN, Costa MSA, Californien
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Klenow-Enzym	Roche, Mannheim
Lachsspermien DNA	Roche, Mannheim
LB Broth Base	Invitrogen, Groningen
LB-Agar	Invitrogen, Groningen
Leupeptin	Roche, Mannheim
Lysozym	Fisher Scientific, Schwerte
Magnesiumchlorid	VWR, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Thüringen
Milchpulver	BioRad, Hercules, München
Na ₂ EDTAx2H ₂ O	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Natriumacetat	VWR, Darmstadt

Chemikalien (Fortsetzung)

Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
Natriumcitrat	VWR, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	VWR, Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR, Darmstadt
Nickelchlorid	VWR, Darmstadt
NZY+-Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Paraformaldehyd	VWR, Darmstadt
PBS-Tween	Sigma, Taufkirchen
Pepstatin A	Roche, Mannheim
Phenol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenol/Chloroform/Isopropanol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Poly-L-Lysine	Sigma, Taufkirchen
Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
Polyvinylpyrrolidon	VWR, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Prolong Antifade Kit	Invitrogen, Groningen
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Protein Assay Dye Lösung	BioRad, München
Protein-A Sepharose Beads	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteinase K	Roche, Mannheim
Proteinlängenmarker	BioRad, Hercules, München
Quick spin columns	Roche, Mannheim
Red Tag DNA Polymerase	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsendonuklease, Puffer	Roche, Mannheim; Biolabs, Frankfurt/M.
RNase A	Qiagen, Hilden
Salpetersäure	VWR, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Thüringen
SDS	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Silikonöl in Isopropanol	Serva, Amstetten
SSC (20x)	Sigma, Taufkirchen
Sucrose	Sigma, Taufkirchen
T4 DNA Ligase, Puffer	Roche, Mannheim
T4 Polynucleotide Kinase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
TEMED	BioRad, Hercules, München
Transferrin	VWR, Darmstadt
Tris	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	VWR, Darmstadt
Triton X100	Fisher Scientific, Schwerte
Xa Removal Resin	Qiagen, Hilden
X-Gal	Roche, Mannheim
Xylene Cyanol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Xylol	Roth, Thüringen

2.2.3 Oligonukleotide

Die Herstellung der Oligonukleotide wurden am MPI für experimentelle Medizin (Göttingen) und bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in Auftrag gegeben. Die Oligonukleotide dienen entweder für die gezielte Mutagenese nach der Quikchange Methode (QC) und dem gleichzeitigen Einbau einer neuen Restriktionsschnittstelle (RE) oder zur Amplifikation von Fragmenten mittels PCR.

Nr	ID	MPI ID	Protein Mutation/Name	Sequenz	RE	Richtung	Vektor	Methode
Neurexin								
1	MM05-187	8815	Nrxn D137A	5'-CAG TTC CTC AGG CCT GGG TGC CTA CCT CGA GCT GCA CAT AC-3'	XhoI	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
2	MM05-188	8816	Nrxn D137A	5'-GTA TGT GCA GCT CGA GGT AGG CAC CCA GGC CTG AGG AAC TG- 3'	XhoI	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC
3	MM05-76	7613	Nrxn D137R	5'- CAGTTCCTCAGGCCTGGG TCGGTACCTTGAGCTGCA CATAAC-3'	KpnI	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
4	MM05-77	7614	Nrxn D137R	5'- GTATGTGCAGCTCAAGGT ACCGACCCAGGCCTGAG GAACTG-3'	KpnI	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC
5	MM05-78	7615	Nrxn G155V + T156A	5'- GGAGTTAAATTTAATGTT GTGGCAGATGATATCGCC ATTGAGGAGTC-3'	EcoRV	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
6	MM05-79	7616	Nrxn G155V + T156A	5'- GACTCCTCAATGGCGATA TCATCTGCCACAACATTA AATTTAACTCC-3'	EcoRV	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC
7	MM05-80	7617	Nrxn L234S + I236S + N238D	5'- GGGCGTCAGTCCACAAG CTTCGATAGCCAAGCAAC CATAATAATTG-3'	HindIII	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
8	MM05-81	7618	Nrxn L234S + I236S + N238D	5'- CAATTATTATGGTTGCTT GGCTATCGAAGCTTGTGG ACTGACGCCC-3'	HindIII	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC
9	MM05-82	7619	Nrxn T235A	5'- GGGCGTCAGCTCGCGAT CTTCAATAGCCAAGCAAC CATAATAATTG-3'	NruI	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
10	MM05-83	7620	Nrxn T235A	5'- CAATTATTATGGTTGCTT GGCTATTGAAGATCGCGA GCTGACGCCC-3'	NruI	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC
11	MM05-185	8813	Nrxn N238A	5'- CAGGGCGTCAACTCACAA TCTTCGCTAGCCAAGCAA CCATAATAATTG-3'	HindII	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
12	MM05-186	8814	Nrxn N238A	5'- CAATTATTATGGTTGCTT GGCTAGCGAAGATTGTG AGTTGACGCCCTG-3'	HindII	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC
13	MM05-172	8217	Nrxn N238R	5'- CAGGGCGTCAACTCACAA TCTTCGCTAGCCAAGCAA CCATAATAATTG-3'	HindII	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
14	MM05-173	8218	Nrxn N238R	5'- CAATTATTATGGTTGCTT GGCTACGGAAGATTGTG AGTTGACGCCCTG-3'	HindII	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC
15	MM06-089		Nrxn N238G	5'- CAGGGCGTCAACTCACAA TCTTCGGGAGCCAAGCAA CCATAATAATTG-3'	HindII	vorwärts	β-1, LNS6-1	QC
16	MM06-090		Nrxn N238G	5'- CAATTATTATGGTTGCTT GGCTCCGGAAGATTGTGA GTTGACGCCCTG-3'	HindII	rückwärts	β-1, LNS6-1	QC

Oligonukleotide (Fortsetzung)

Nr	ID	MPI ID	Protein	Mutation/Name	Sequenz	RE	Richtung	Vektor	
17	MM05-62		Nrxn	α LNS1	5'- GCGTCGACTCTGGAGTTC CCAGGCGCTGAGGGCCA- 3'	SalI	vorwärts	L2	PCR
18	MM05-63		Nrxn	α LNS1	5'- CTCTAGAGTTCTACCTTC AATGCTCCCGCCCCGCT ATTGG-3'	XbaI	rückwärts	L2	PCR
19	MM05-103		Nrxn	α LNS2	5'- GGGGATCCGATTGCCAC ATTCAAGGGATCTGAGTA CTTCTGC-3'	BamHI	vorwärts	L2 for pET42b+	PCR
20	MM05-104		Nrxn	α LNS2	5'- CTTGTCGACGCGTCCCTC AATGGTTGCCACATTTTC ACACTTAAAAGCCACC-3'	SalI	rückwärts	L2 for pET42b+	PCR
21	MM05-64		Nrxn	α LNS2	5'- GCGTCGACTATTGCCACA TTCAAGGGATCTGAGTAC TTCTGC-3'	SalI	vorwärts	L2	PCR
22	MM05-65		Nrxn	α LNS2	5'- TCGGGATCCTCTCTACCT TCAATGGTTGCCACATTT TCACACTTAAAAGCCACC- 3'	BamHI	rückwärts	L2	PCR
23	MM05-66		Nrxn	α LNS3	5'- GCGTCGACTCCAATCACT TTTGAGACCCAGAATCT TTCATTTTC-3'	SalI	vorwärts	L2	PCR
24	MM05-67		Nrxn	α LNS3	5'- TCGGGATCCTCTCTACCT TCAATCCTTGAGCAGGAT GGCTTCACTCCAGCAG-3'	BamHI	rückwärts	L2	PCR
25	MM05-70		Nrxn	α LNS4	5'- GCGTCGACTGAGAGAGA GGCAACGGTTTTGAGCTA CGATGG-3'	SalI	vorwärts	L2	PCR
26	MM05-71		Nrxn	α LNS4	5'- TCGGGATCCTCTCTACCT TCAATCCAAACCTGGCA TTGAGTTCACAATAATCT ATATC-3'	BamHI	rückwärts	L2	PCR
27	MM05-72		Nrxn	α LNS5	5'- GCGTCGACTCCTGTCACC TTCAAGACCAAATCAAGC TATG-3'	SalI	vorwärts	L2	PCR
28	MM05-73		Nrxn	α LNS5	5'- TCGGGATCCTCTCTACCT TCAATGGGCCCTTCGCAT CCTCTCTCAA-3'	BamHI	rückwärts	L2	PCR
29	MM05-74		Nrxn	α LNS6	5'- GCGTCGACTGGGACGAC GTATATCTTTAGCAAAGG TGGTGG-3'	SalI	vorwärts	L2	PCR
30	MM05-75		Nrxn	α LNS6	5'- TCGGGATCCTCTCTACCT TCAATAGTTGTCATAGAG GAAGGCACTTCACCGACC AGC-3'	BamHI	rückwärts	L2	PCR
Neurologin									
31	MM07-50	12250	Nlgn	P100S	5'- GAACATCGATTTTCAGCCT CCTGAGTCACCATCTCCC TGGTCTGATATC-3'	DdeI	vorwärts	NNI1 Δ B, I1Igg Δ B	QC
32	MM07-51	12251	Nlgn	P100S	5'- GATATCAGACCAGGGAG ATGGTGACTCAGGAGGC TGAAATCGATGTTC-3'	DdeI	rückwärts	NNI1 Δ B, I1Igg Δ B	QC
33	MM07-86	Sigma	Nlgn	P192A	5'- GATATTCGCGACAGTGG GGGTGCGAAACCAAGTGA TGGTGTACATC-3'	NruI	vorwärts		QC

Oligonukleotide (Fortsetzung)

Nr	ID	MPI ID	Protein	Mutation/Name	Sequenz	RE	Richtung	Vektor
34	MM07-87	Sigma	Nlgn	P192A	5'- GATGTACACCATCACTGG TTTCGCACCCCACTGTC GCGAATATC-3'	NruI	rückwärts	QC
35	MM07-52	12252	Nlgn	G266D	5'- GATGGACCAGCGAGAAC ATCGATTTCTTTGGTGGT GACCCCTTG-3'	ClaI	vorwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
36	MM07-53	12253	Nlgn	G266D	5'- CAAGGGGTCACCACCAA AGAAATCGATGTTCTCGC TGGTCCATC-3'	ClaI	rückwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
37	MM07-82	Sigma	Nlgn	G266DL273D	5'- CGATTTCTTTGGTGGTGA CCCCGATCGAATCACCGT GTTTGGATC-3'	PvuI	vorwärts	QC
38	MM07-83	Sigma	Nlgn	G266DL273D	5'- GATCCAAACACGGTGATT CGATCGGGGTCACCACC AAAGAAATCG-3'	PvuI	rückwärts	QC
39	MM07-54	12254	Nlgn	D271R	5'- CATTGGGTTCTTTGGTGG TCGACCCTTGCGAATCAC CGTG-3'	SalI	vorwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
40	MM07-55	12255	Nlgn	D271R	5'- CACGGTGATTCGCAAGG GTCGACCACCAAAGAACC CAATG-3'	SalI	rückwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
41	MM07-56	12256	Nlgn	L273E	5'- GGTCTTTGGTGGGGATC CCGAGCGAATCACCGTGT TTGGATCAGG-3'	BamHI	vorwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
42	MM07-57	12257	Nlgn	L273E	5'- CCTGATCCAAACCGGTG ATTCGCTCGGGATCCCA CCAAAGAACC-3'	BamHI	rückwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
43	MM07-84	Sigma	Nlgn	L273G	5'- CTTTGGTGGTGACCCCGG GCGAATCACCGTGTGTTG- 3'	SmaI	vorwärts	QC
44	MM07-85	Sigma	Nlgn	L273G	5'- CAAACACGGTGATTGCGC CGGGGTCACCACCAAAG- 3'	SmaI	rückwärts	QC
45	MM07-58	12258	Nlgn	H294V	5'- GTCAATCTGCTGACTTTC TCAGTTTATTCTGAAGGT AACCGTTGGAGC-3'	DdeI	vorwärts	NNI1+B, I1Igg+B
46	MM07-59	12259	Nlgn	H294V	5'- GCTCCAACGGTTACCTTC AGAATAAACTGAGAAAGT CAGCAGATTGAC-3'	DdeI	rückwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
47	MM05-191	8819	Nlgn	-B	5'- GCTGACTTTATCCCATTA TTCTGAAGGACTTTTTCA ACGAGCAATAGC-3'	-BstEII	vorwärts	NI-11, NI1Igg
48	MM05-192	8820	Nlgn	-B	5'- GCTATTGCTCGTTGAAAA AGTCCTTCAGAATAATGG GATAAAGTCAGC-3'	-BstEII	rückwärts	NI-11, NI1Igg
49	MM07-80	12260	Nlgn	L399S	5'- GATACTGATGGAACAAGG AGAATTCTCCAATTATGA TATCATGTTAGG-3'	EcoRI	vorwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
50	MM07-81	12261	Nlgn	L399S	5'- CCTAACATGATATCATAA TTGGAGAATTCTCCTTGT TCCATCAGTATC-3'	EcoRI	rückwärts	NNI1ΔB, I1IggΔB
51	MM05-193	8821	Nlgn	ΔEF1	5'- GGTTGAAGCTTGTGGAAA ACATAGTAGCTGTCTCTA ATTTTGTG-3'	HindIII	vorwärts	NI-11, NI1Igg
52	MM05-194	8822	Nlgn	ΔEF1	5'- CAACAAAATTAGAGACAG CTACTATGTTTTCCACAA GCTTCAACC-3'	HindIII	rückwärts	NI-11, NI1Igg

Oligonukleotide (Fortsetzung)

Nr	ID	MPI ID	Protein Mutation/Name	Sequenz	RE	Richtung	Vektor	
53	MM05-189	8817 Nlgn	A557D+V558R	5'- CCAAGAATGATGTGATGT TGAGCGATCGAGTAATGA CATACTGGACG-3'	PvuI	vorwärts	NI-11, NI1Igg	QC
54	MM05-190	8818 Nlgn	A557D+V558R	5'- CGTCCAGTATGTCATTAC TCGATCGCTCAACATCAC ATCATTCTTGG-3'	PvuI	rückwärts	NI-11, NI1Igg	QC
Andere								
55	MM05-59	7431 IgG	pCMVIg-GC-HF	5'- ATAAGCTTGATATCGAAT TCCGTGATCTCTCTTGAG- 3'				PCR
56	MM05-60	7432 IgG	pCMVIg-GC-HR	5'- TGAAGCTTAGTACTACC CTCGGGATCGGGATCCTC TAGAGTCGACGCCCACT GCCCAGCTCTGCCC-3'				PCR
57	MM05-90	IgG	pCMVIg-delta17-1	5'- TGAAGCTTAGTACTACC CTCGGGATCGGGATCCTC TAGAGTCGACGCCCACT GCCCAGCTCTGCCC-3'				PCR

2.2.4 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue MRF, Stratagene, La Jolla, CA, USA

Escherichia coli XL10-Gold, Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.2.5 Flüssigmedien und Zusätze

Laura Bertani (LB)-Medium: 16 g Peptone 140, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 L DDW.

NZY⁺-Medium: LB-Medium, 1 M MgCl₂ (6 H₂O), 1M MgSO₄ (6 H₂O), 2 M Glukose.

Penicillin: 10000 IE/mL

Streptomycin: 10000 µg/mL

LB-Agar: 1 L LB-Medium, 12.5 g Agar

2.2.6 Zellkulturen und Säuger

HEK293, Invitrogen

2.2.7 Antikörper

Anti-Neurexin, A473 (Kanninchen), freundlicherweise von Prof. Thomas Südhof (UTSW, Dallas, USA) erhalten (Ushkaryov et al., 1992).

Der Anti-Neurologin Antikörper 4C12 erkennt die CAM-Domäne von Neurologin 1, während die Antikörper 799 und 804 jeweils spezifisch für den C-Terminus von Neurologin 2 und 3 sind. Die Neurologin-Antikörper wurden freundlicherweise von Nils Brose (MPI, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Anti-Neurexophilin 1 wurden in Kanninchen gegen das Peptid AQQTV IDAKD SKSC

produziert und affinitätsgereinigt (Eurogentec, Belgium).

Die Zweit-Antikörper gegen Kannechen und Maus wurden aus Ziegen gewonnen (BioRad, Hercules).

2.2.8 Vektoren

Neurexin 1 α cDNA in pCMV5 (Konstrukname: pCMVL2); Datenbank: NM_021767 (Ushkaryov et al., 1992).

Neurexin 1 β cDNA in pCMV5 (Konstrukname: pCMVL13); Datenbank: NM_021767 (Ushkaryov et al., 1994). Beide Vektoren freundlicherweise von Prof. Thomas Südhof (UTSW, Dallas, USA) erhalten.

Neurologin-1 cDNA in pCMV5 (Konstrukname: NL-11)

Neurologin-1 cDNA der extrazellulären Domäne in pCMV5Ig (Konstrukname: NL-1)

Neurologinkonstrukte wurden freundlicherweise von Prof. Niels Brose (MPI, Göttingen) erhalten.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1 Herstellung von Vektoren und deren Mutationen

Der in vorherigen Publikationen verwendete IgG-Kontrollvektor pCMV-GC (Ushkaryov et al., 1994) wie auch dessen Derivate enthielt neben dem gewünschten Gen für das humane IgG Fc Fragment zusätzlich noch rudimentäre *nrxn1* cDNA, welche für 18 Reste der Nrnx 1 α LNS1 Domäne kodiert (LEFPG AEGQW TRFPK WNA). Diese Reste gehören einem Teil des hydrophoben Klusters innerhalb der Modellstruktur der α LNS1 Domäne an und könnten Zielproteine unspezifisch binden. Deshalb wurde ein neuer IgG-Kontrollvektor generiert, bei dem 17 dieser Reste entfernt wurden (2.3.1.1). Der erhaltene pCMV-GCAN17 Vektor (Kontrollvektor) kodiert für folgendes sekretorische Protein: Signalpeptid(Nrxn1)-ASTLE-IgG1Fc. Die cDNA für die artifizielle ASTLE Sequenz enthält die Klonierungsschnittstellen *SalI-XbaI-BamHI*, die für die Herstellung von IgG-Fusionsproteinen mit Nrnx 1 α Domänen genutzt wurden.

Die Expressionsvektoren pCMVIg α LNS6(-SS4) und pCMVIg α LNS6(+SS4) wurden hergestellt, in dem das für die Nrnx 1 α LNS6 Domäne (GTTYI ... VGEVP) kodierende Fragment jeweils mittels PCR aus den Vektoren pCMVIg β -1 oder pCMVIg β -3 (Ushkaryov et al., 1994) amplifiziert und in den *SalI* und *BamHI* (Biolabs) geschnittenen neuen Kontrollvektor inseriert wurde. Beide Vektoren sekretieren in COS-7 Zellen das splice site SS4 enthaltene (+SS4) oder fehlende (-SS4) Fusionsprotein AST-(LNS6)-SSMTTIEGRE-IgG1Fc, welches mit der IEGR Sequenz eine funktionelle Xa Proteaseschnittstelle enthält. Die gezielten Mutationen an der α LNS6 und der β LNS

Domäne wurden anhand des Quikchange Protokolls (Stratagene) an den SS4 defizienten Templates pCMVlgβ-1(-SS4) and pCMVlgαLNS6(-SS4) durchgeführt. Für weitergehende Experimente an α-Neurexinen, wurden in den pCMV-ΔN17 Vektor auch PCR Fragmente der einzelnen αLNS Domänen 1 bis 5 inseriert, die aus dem gesamt α-Neurexin enthaltenen Vektor L2 (Ushkaryov et al., 1994) amplifiziert wurden. Die Domänengrenzen wurden vorab durch Vergleiche homologer Strukturen bestimmt. Über das gleiche Verfahren wurden auch IgG-Fusionsproteine von Laminin 2αLNS3 und 2αLNS5, sowie APCS unter Verwendung der jeweiligen I.M.A.G.E.-Clones IRAKp961I19116Q (LAMA2) und IRAKp961M14242Q (APCS) produziert (<http://www.imagenes-bio.de>).

Zur Funktionsanalyse in lebenden Zellen einiger in den LNS Domänen eingeführten

DNA-Konstrukte zur Expression in mammalia Zellen

Nr.	Vektor	Kurzbez.	Mutation		Templates		Primer		Kontroll RF	Referenz
			Proteinsequenz	Vektor		Insertion	vorwärts	rückwärts		
Neurexine										
1	pCMV-GC	GC			pCMV5	<i>nrxn1</i> SP, Ratte; <i>hsigg1cp</i> IgG1 Fc, Mensch				{Ushkaryov
2	pCMV-GCAN17	ΔN17	LEF...KWN/Deletion		GC			MM05-59	MM05-60	hier
3	ΔN17-LNS1	al1			ΔN17	L2 LNS1, Ratte				hier
4	ΔN17-LNS2	al2			ΔN17	L2 LNS2 -SS2, Ratte				hier
5	ΔN17-LNS22	al22			ΔN17	pCMVlg-Nx1a-22 +SS2A, Ratte				hier
6	ΔN17-LNS3	al3			ΔN17	L2 LNS3, Ratte				hier
7	ΔN17-LNS4	al4			ΔN17	L2 LNS4 +SS3A, Ratte				hier
8	ΔN17-LNS5	al5			ΔN17	L2 LNS5, Ratte				hier
9	ΔN17-LNS61	a61			ΔN17	b-1 LNS, Ratte				hier
10	ΔN17-LNS61 D1183A	ada	D1183A		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM05-187	MM05-188	hier
11	ΔN17-LNS61 D1183R	adr	D1183R		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM05-76	MM05-77	hier
12	ΔN17-LNS61 G1201V/T1202A	agt	G1201+T1202		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM05-78	MM05-79	hier
13	ΔN17-LNS61 LIN1280/82/84SSD	alin	L1280S+I1282S+N1284D		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM05-80	MM05-81	hier
14	ΔN17-LNS61 T1281A	ata	T1281A		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM05-82	MM05-83	hier
15	ΔN17-LNS61 N1284A	ana	N1284A		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM05-185	MM05-186	hier
16	ΔN17-LNS61 N1284G	42, ang	N1284G		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM06-089	MM06-090	hier
17	ΔN17-LNS61 N1284R	anr	N1284R		ΔN17	b-1 LNS, Ratte		MM05-172	MM05-173	hier
18	ΔN17-LNS63	a63			ΔN17	b-3 LNS +SS4, Ratte				hier
19	pCMV B-1 D137A	bda	D137A		b-1			MM05-187	MM05-188	hier
20	pCMV B-1 D137R	bdr	D137R		b-1			MM05-76	MM05-77	hier
21	pCMV B-1 G155V/T156A	bgt	G155V+T156A		b-1			MM05-78	MM05-79	hier
22	pCMV B-1 LIN234/6/8SSD	blin	L234S+I236S+N238D		b-1			MM05-80	MM05-81	hier
23	pCMV B-1 T235A	bta	T135A		b-1			MM05-82	MM05-83	hier
24	pCMV B-1 N238A	bna	N238A		b-1			MM05-185	MM05-186	hier
25	pCMV B-1 N238G	32, bng	N238G		b-1			MM06-089	MM06-090	hier
26	pCMV B-1	b-1			pCMV5	β- <i>nrxn1</i> -SS4, Ratte				{Ushkaryov
27	pCMV B-3	b-3			pCMV5	β- <i>nrxn1</i> +SS4, Ratte				{Ushkaryov
28	pCMV-L13 (<i>nrxn1b</i>)	L13			pCMV5	β- <i>nrxn1</i> +SS4, Ratte				{Ushkaryov
29	pCMV-L2 (<i>nrxn1a</i>)	L2			pCMV5	α- <i>nrxn1</i> +SS3A,4, Ratte				{Ushkaryov
30	pCMV-N-EGFP-Nrx1a	nena			L2	EGFP-C1, Qualle				{Masius, 2f
31	pCMV-N-EGFP-Nrxn1b	nenb			L13	EGFP-C1, Qualle				{Masius, 2f
32	pCMVlg-Nx1a-22				pCMV5	α- <i>nrxn1</i> LNS2 +SS2A, Ratte				
Neuroigline										
33	pCMV NL-1ΔB P100S	nps	P100S		Δb			MM07-50	MM07-51	hier
34	pCMV NL-1ΔB P192A	npa	P192A		Δb			MM07-86	MM07-87	hier
35	pCMV NL-1ΔB G266D	ngd	G266D		Δb			MM07-52	MM07-53	hier
36	pCMV NL-1ΔB G266D/L273D	ngdid	G266D+L273D		Δb			MM07-82	MM07-83	hier
37	pCMV NL-1ΔB D271R	ndr	D271R		Δb			MM07-54	MM07-55	hier
38	pCMV NL-1ΔB L273E	nle	L273E		Δb			MM07-56	MM07-57	hier
39	pCMV NL-1ΔB L273G	nlg	L273G		Δb			MM07-84	MM07-85	hier
40	pCMV NL-1 H294V	nhv	H294V		NI11			MM07-58	MM07-59	hier
41	pCMV NL-1ΔB	Δb, -B, 85	GNRWSNSTK/Deletion		NI11			MM05-191	MM05-192	hier
42	pCMVlgNL-1ΔB	igΔb	GNRWSNSTK/Deletion		IgNI1			MM05-191	MM05-192	hier
43	pCMV NL-1 L399S	nls	L399S		Δb			MM07-80	MM07-81	hier
44	pCMV NL-1-ΔEF2	Δef	DSD...FDF/Deletion		NI11			MM05-193	MM05-194	hier
45	pCMVlg NL-1-ΔEF2	igΔef	DSD...FDF/Deletion		IgNI1			MM05-193	MM05-194	hier
46	pCMVlgNL1-ΔEF2	91	DSD...FDF/Deletion		IgNI1			MM05-193	MM05-194	hier
47	pCMVlgNL1-ΔEF2	94	DSD...FDF/Deletion		IgNI1			MM05-193	MM05-194	hier
48	pCMV NL-1 A557D/V558R	av	A557D+V558R		NI11			MM05-189	MM05-190	hier
49	pCMVlg NL-1 A557D/V558R	igav	A557D+V558R		IgNI1			MM05-189	MM05-190	hier
50	pCMVlg NL-1A557D/V558R c3	igav3	A557D+V558R		IgNI1					hier
51	pCMV NL-11 ΔL34	ΔL34, 19	VPQ...NRF/Deletion		NI11					hier
52	pCMV NL-11 ΔL34+HSQ	ΔL34, 29	VPQ...NRF/HSQ		NI11					hier
53	pCMVlg NL-1-ΔL34 c6	igΔL34	VPQ...NRF/Deletion		IgNI1					hier
54	pCMVlg NL-1-ΔL34+ c3	igΔL34+3	VPQ...NRF/Deletion		IgNI1					hier
55	pCMVlg NL-1-ΔL34+ c5	igL34+5	VPQ...NRF/Deletion		IgNI1					hier
56	pCMV NL-11	nli1, NI11			pCMV5	<i>nlg1</i> +A +B, Ratte				{Nauven, 1
57	pCMVlg NL-1	IgNI1, NI-1			pCMV5	<i>nlg1</i> +A, B, Ratte; <i>hsigg1cp</i> , Mensch				{Nauven, 1
Andere										
58	pCMVD2 (NXPH)	d2			pCMV5	<i>nrxp1</i> ,Ratte				{Benalopod
59	ΔN17-Lama2 L3	L2L3, 542			ΔN17	IRAKp961I19116Q, <i>lama2</i> LNS3, Maus				hier
60	ΔN17-Lama2 L5	L2L5			ΔN17	IRAKp961I19116Q, <i>lama2</i> LNS5, Maus				hier
61	ΔN17-APCS	APCS, 431			ΔN17	IRAKp961M14242Q, <i>apcs</i> LNS, Rind				hier
62	Egfp-C1 (clontech)	egfp, gfp			pCMV5	EGFP, Qualle				BD Bioscience S, Heidelberg, Germany

Mutationen, wurden diese Mutationsstellen auch in das GFP-markierte β -Neurexin (IENB, Richard Fairless und Markus Missler) eingebaut. Hierzu wurde ein *PstI-SalI* Fragment aus IENB mit einem der mutierten pCMVIg β -1 (β L234S+I236S+N238D und β N238A) ausgetauscht.

Von den *nlg1* Vektoren pCMVNL11 und pCMVIgNI-1 (Nguyen und Sudhof, 1997) wurde mittels Quikchange Protokoll der Sequenzabschnitt entfernt, der für das *splice insert* B (+B) NRWSNSTKG kodiert. An allen vier Vektoren wurden gezielte Mutagenesen durchgeführt, die zur Produktion von mutiertem Gesamt-Neurologin 1 oder C-terminal IgG-fusionierten IgG-Neurologin 1 jeweils mit und ohne SSB dienen. Die für Klonierungen und Mutagenesen verwendeten Primersequenzen und eingebauten Kontrollschnittstellen sind in Kapitel 2.2.3 gelistet. Alle finalen Konstrukte (siehe unten) wurden durch DNA-Sequenzierung (am MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen oder von Fa. GATC, Konstanz) unter teilweiser Verwendung von spezifischen Primern (Kapitel 2.2.3) verifiziert.

2.3.1.2 Allgemeines Protokoll für Klonierungen und gezielte Mutagenesen

Die Herstellung von neu kombinierten oder mutierten Plasmiden begann mit dem Design geeigneter Primer, die zur späteren Identifizierung entweder eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle enthielten oder eine im Plasmid vorhandene entfernten. Die Auswahl der Primer erfolgte in der Regel manuell unter Beachtung der für die jeweilige Methode erlaubten Basenlängen und Schmelztemperaturen (Kapitel 2.2.3). Die Primer wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt und dienten meist zur Amplifikation eines für eine Proteindomäne (z.B. Nr_{xn} 1 α LNS6) kodierenden DNA-Abschnittes aus einem Ausgangsplasmid. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, ausgeschnitten und gereinigt (QiaExII-Protokoll). Die Enden der gereinigten DNA-Fragmente wurden über einen Restriktionsverdau geschnitten, über eine Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und an einen mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffneten Zielplasmid ligiert. Die Religation des Zielplasmids wurde durch eine vorab durchgeführte Dephosphorylierung des linearisierten Vektors stark reduziert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* transformiert, die Kultur für 1 Stunde in LB-Medium angezogen und abschliessend auf Antibiotika versetzten LB-Agar Platten ausgestrichen. Am folgenden Tag wurden mehrere Klone gepickt und in 5 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika übernacht angezogen. Mit Aliquots dieser Einzelklonkulturen wurde eine schnelle Plasmid-DNA Reinigung (Express Mini Protokoll) und anschliessende Restriktionsanalyse durchgeführt. Bei erfolgreicher Identifizierung des veränderten Restriktionsmusters wurden bis zu drei Plasmide ausgewählt, über ein Säulenverfahren (Quiagen Mini) gereinigt und zur DNA-Sequenzierung in Auftrag gegeben (MPI Göttingen, GATC Konstanz). Abschliessend wurden von den nachgewiesenen Plasmiden Stammlösungen mit bis zu 2 μ g/ μ L DNA über das Quiagen Maxi-Verfahren hergestellt und bei 4° gelagert. Für die Transfektion von COS-7 oder HEK Zellen wurden ausschliesslich letztere DNA-Lösungen verwendet.

Für die gezielten Mutagenesen wurden Primer hergestellt, die zur späteren Identifizierung

der mutierten Plasmide entweder eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle enthielten oder eine vorhandene entfernt hatten (Kapitel 2.2.3). Die PCR-Reaktion, der DpnI-Verdau des Ausgangsplasmids und die Transformation der mutierten Plasmids in *E. coli* folgte dem Quikchange-Protokoll (Invitrogen), während die Analyse und Weiterverarbeitung der Einzelklonkulturen wie oben beschrieben durchgeführt wurden.

2.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Expand™ High Fidelity System

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die selektive Vervielfältigung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz. Für diese enzymatische Reaktion werden zwei Primer benötigt, die das zu amplifizierende Fragment flankieren und deren Sequenz zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist (Saiki et al., 1988). Der PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstranges. Während der folgenden „Annealing-Phase“ binden die synthetisch hergestellten Oligonukleotide an die komplementären DNA-Einzelstrangbereiche. Die 3'-Enden der Oligonukleotide liefern der Taq-Polymerase freie OH-Enden für die anschließende Extension. Aufgrund der Hitzestabilität der Taq-Polymerase können bis zu 30 Zyklen und mehr (Denaturierung, Annealing, Extension) ohne Zusatz von neuem Enzym durchgeführt werden (Mullis und Faloona, 1987). Die Länge der einzelnen Primer war mindestens 21 Nukleotide lang und hatte eine Schmelztemperatur von über 58°C (Kapitel 2.2.3).

Lösungen: Reaktionspuffer mit MgCl₂ (10-fach), dNTP-Mix (10 mM), Primerverdünnungen (5 OD), Template-DNA-Verdünnung (10 ng/μL, 1:300 der MaxiPrep).

Reaktionsansatz:

2 μL	Reaktionspuffer (10-fach, inkl. MgCl ₂)
1 μL	dsDNA (10 ng, 1:300 der MaxiPrep)
1 μL	Vorwärtsprimer (5 OD)
1 μL	Rückwärtsprimer (5 OD)
1 μl	dNTP Mix
13 μL	DDW
1 μL	Enzym-Mix (Taq-Polymerase)

PCR-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96°C	5 Minute
2	30	95°C	1 Minute
		58°C	1 Minute
		72°C	2 Minuten
3	1	72°C	1 Minuten

Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und das gewünschte DNA Fragment isoliert.

2.3.1.4 In vitro Mutagenese mit dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit

Der QuikChange® Mutagenese Kit (Invitrogen) ermöglicht Punktmutationen, Änderungen von Aminosäuren bzw. Entfernen oder das Einführen von einzelnen oder multiplen Aminosäuren. Ähnlich wie bei der PCR wird das automatisierte Verfahren in drei verschiedenen Temperaturstufen durchgeführt. Die Anlagerung der Mutageneseprimer und die Synthese der komplementären Stränge erfolgt nach der Trennung der beiden Elternstränge durch Hitzedenaturierung. Hierfür wird eine *Pfu Turbo* DNA Polymerase verwendet. Das mutierte Plasmid weist nach der PCR noch Einzelstrangbrüche auf. Durch Zugabe des Enzyms DpnI werden die methylierten Nucleotide des nicht mutierten Elternplasmides verdaut. Mit einer Transformation des Ansatzes in einen speziellen „ultrakompetenten“ E.coli Stamm (XL10-Gold) werden die Einzelstrangbrüche durch eine bakterieneigene Ligase repariert.

Lösungen: NZY⁺-Medium: LB-Medium, 1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄, 2 M Glukose; Reaktionspuffer (10-fach); dNTP Mix; Quiklösung; *PfuTurbo* DNA Polymerase (2.5 U/μL); DpnI (10 U/μL), β-Mercaptoethanol-Lösung (β-ME);

Reaktionsansatz:

5 μL	Reaktionspuffer (10-fach)
10 ng	dsDNA des zu mutierenden Plasmids
125 ng	Vorwärtsprimer
125 ng	Rückwärtsprimer
1 μl	dNTP Mix
3 μL	Quiklösung
+	DDW zum finalen Volumen von 50 μL
1 μL	<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2.5 U/μL)

PCR-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	1 Minute
2	18	95°C	50 Sekunden
		60°C	50 Sekunden
		68°C	7 Minuten
3	1	68°C	7 Minuten

Nach der PCR wurden dem Ansatz 1 µL DpnI Lösung zugefügt und für 1 Stunde bei 37°C im PCR-Gerät inkubiert. Einem 45 µL Aliquot einer in Eis angetauten XL10-Gold Kultur wurde 2 µL β-ME beigemischt und die Kultur für 10 min auf Eis gestellt, wobei sie alle 2 min geschwenkt wurde. Nach weiteren 10 min ohne Schwenken auf Eis wurden 2 µL der DpnI verdauten DNA-Lösung zupipettiert und diese Zellkultur für 30 min auf Eis belassen. Die Zellkultur wurde für exakt 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad zur Transformation der Zellen geschwenkt und danach für 2 min auf Eis gestellt. Der Kultur wurden 500 µL 42°C warmes NZY⁺-Medium hinzugefügt und diese für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 250 µL der Lösung wurden auf LB-Agar-Platten (mit 1/1000 Ampicillin-Lösung) ausgestrichen.

2.3.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA zur 'Express-Mini'-Analyse (Holmes und Quigley, 1981)

Zur schnellen Restriktionsanalyse wurden aus E.coli Einzelklonkulturen nach der Methode von Holmes und Quigley (1981) bis zu 20 µg Plasmid-DNA gewonnen.

Lösungen: STET-Puffer (8% Sucrose, 0.5% Triton X100, 10 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0), TE-Puffer, 100%-ige und 70%-ige kalte Ethanollösung (-20°), Lysozym-Lösung (10 mg/mL DDW)

1.5 ml der E. coli Einzelklonkultur wurde in einem Eppendorfgefäß 1 min mit 12000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 25 µl frisch angesetzter Lysozymlösung (10 mg/mL DDW) versetzt. Die Suspension wurde für 45 s bei 100°C inkubiert und anschließend 10 min mit 12000 g zentrifugiert. Die erhaltenen Zelldebris wurden mit einem Zahnstocher aus der Lösung entfernt. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit 50 µl 7.5 M Ammoniumacetat und 500 µl 100%-igem Ethanol versetzt und 15 min lang mit 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet mit kaltem 70%-igem Ethanol (-20°C) einmal gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet bei RT oder im 37° Wasserbad getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

2.3.1.6 Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA ("Q-Mini")

Um für die Sequenzierung reine Plasmid-DNA zu erhalten, wurde die Präparation mit dem "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Q-Mini, Quiagen) durchgeführt.

Lösungen: P1 (0.1 mg/mL RNase A in 50 mM Tris/HCL, 10 mM EDTA, pH 8.0), P2 Lysispuffer (0.2 M NaOH, 1% SDS), N3 Neutralisationspuffer, PB, PE, EP (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Über die Zusammensetzung der Lösungen N3, PB und PE gibt es keine Herstellerangaben.

Ein Aliquot von 3-5 ml einer Einzelklonkultur wurde 10 min lang mit 6000 g bei 4°C zentrifugiert (5810R Eppendorf Zentrifuge), der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 250 µl P1 resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zu der Zellsuspension wurden 250 µl P2 gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl N3 erfolgte eine Inkubation von 5 min auf Eis. Die Suspension wurde 10 min mit 25000 g zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der Überstand auf eine Qiagen-Minisäule gegeben. Die Säulen wurden bei RT mit 25000 g zentrifugiert und die DNA an die enthaltenen Silicakügelchen gebunden. Die Säule wurden durch erneute Zentrifugation mit 500 µl PB und anschließend mit 750 µl PE gewaschen. Zur Trocknung der Säule wurde ein weiteres mal zentrifugiert. Die Minisäule wurde in ein leeres Eppendorfgefäß platziert und 50 µl EB direkt auf die Membran der Säulenmatrix aufgetragen. Nach einminütiger Inkubation wurde die reine DNA durch eine abschliessende Zentrifugation eluiert. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde spektrometrisch bestimmt und bei 4° gelagert.

2.3.1.7 Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA (Q-Maxi)

Um bis zu 1 mg reine Plasmid-DNA zu erhalten wurde der "QIAGEN Plasmid Maxi Kit" (Quiagen) verwendet. Die Bakterien wurden hierbei durch alkalische Lyse aufgespalten, die Proteine und das Chromatin abzentrifugiert und die überständige Plasmid-DNA an eine Säulenmatrix gebunden. Nach Waschungen wurde die reine Plasmid-DNA mit alkalischem salzhaltigen Puffer eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und in TE-Puffer resuspendiert.

Lösungen: P1, P2, P3, QBT, QC, QF

Zur Isolierung von reiner DNA in größeren Mengen wurden 500 ml eines LB/Amp.-Mediums (Ampicillin 1:1000) mit einer Einzelklonkultur angeimpft, 14-16 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde bei 4 °C 15 min lang mit 5000 g zentrifugiert (Ultrazentrifuge) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml P1 resuspendiert, mit 10 ml P2 versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Der Zellsuspension wurden 10 ml P3 zugesetzt und diese für 20 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation mit 20000 g bei 4°C wurde der Überstand filtriert (Whatmann-Filter) und auf eine QBT-equilibrierte Maxisäule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 25 ml QC-Puffer gewaschen bevor die DNA mit 15 ml QF aus der Matrix eluiert wurde. Das Eluat wurde

mit 10.5 ml Isopropanol versetzt und für 5 min auf Eis gestellt. Die DNA wurde 30 min bei 4°C zentrifugiert, das Pellet für 10-15 min bei RT getrocknet und abschliessend in 0.5 ml TE resuspendiert. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde photometrisch bestimmt und die Lösung bei 4°C gelagert.

2.3.1.8 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (QiaEx II)

Lösungen: QX1, QIAEX II, PE

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zum Gel wurde die dreifache Menge QX1, 12 µl QIAEX II (Silikon Partikel) und 5 µl Na-Acetat gegeben und der Ansatz 10 min bei 50°C im Heizblock inkubiert. Die Lösung wurde alle 2 min durchmischt. Der Ansatz wurde anschließend für 30 s bei 12000 g zentrifugiert (Eppendorf Microfuge) und der Überstand dekantiert. Die Silikon Partikel wurden mit 500 µl QX1 resuspendiert und erneut für 30 s zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl RE gewaschen, für ca. 10-15 min bei RT getrocknet und abschliessend in 20 µl DDW resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die Partikel abzentrifugiert und der Überstand mit der reinen DNA bei -20° gelagert.

2.3.1.9 Phenol-Chloroform-Extraktion

Lösungen: Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)

Die zu extrahierende DNA wurde auf ein Volumen von 100 µl mit DDW aufgefüllt, mit gleichem Volumen der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung versetzt und gemischt (Vortexer). Nach zehnminütiger Zentrifugation mit 12000 g bildeten sich drei Phasen, deren obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Zur Entfernung von Phenolresten wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und abermals zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde entnommen und die enthaltene DNA mit Ethanol präzipitiert.

2.3.1.10 Ethanol-Präzipitation von DNA

Lösungen: 3.3 M Na-Acetat, 100%- und 70%-ige kalte Ethanollösung (-20 °C),

Eine wässrige DNA-Lösung wurde mit einer 3.3 M Na-Acetat Lösung (1/10 des Gesamtvolumens) und mit 100%igem Ethanol (2.5 fachen Gesamtvolumens) versetzt, gemischt (Vortexer) und für 30 min bei -20°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei RT für 15 min bei 25000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde mit

200 µl eiskaltem 70%-igem Ethanol überspült und für erneute 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet bei RT oder im 37 °C Wasserbad getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde in 20-50 µL DDW resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.1.11 Restriktionsendonuklease-Verdau von DNA

Lösungen: Restriktionspuffer (10-fach konzentriert): A, B, H, L und M (Roche), 1, 2, 3 und 4 (BioLabs), BSA (100-fach, 10 mg/mL DDW), Stopp-Mix, Ladepuffer (10-fach, 57% Glycerin, 100 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA (Na₂, 2H₂O), 0.001% Bromphenolblau)

Ansätze für einen analytischen Verdau: 1 µl DNA (1-2 µg), 1.5 µl Puffer, 1 µl Enzym ad 15 µl DDW;

für einen präparativen Verdau: 4 µl DNA (1-2 µg), 6 µl Puffer, 2 µl Enzym ad 60 µl DDW

Die einfachen und die multiplen Restriktionsendonuklease-Spaltungen wurden nach Herstellerangaben für die jeweils verwendeten Enzyme durchgeführt. Für die Spaltung von 1 µg DNA wurde die Menge von 1 unit Enzym eingesetzt und mindestens 2 Stunden verdaut. Der präparative Ansatz wurde über Nacht verdaut. Falls von der Firma keine anderen Empfehlungen vorlagen, wurde die DNA mit dem Enzym bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von Stop-Mix zum Auftragen auf ein Agarose-Gel oder durch direkte Aufreinigung der DNA beendet.

2.3.1.12 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Möglichkeit einer Religation des Ausgangsplasmids zu vermeiden, wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden des Restriktionsverdauten Ausgangsplasmids mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) entfernt.

Lösungen: Dephosphorylierungspuffer (10-fach, 0.5 M Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.5), Alkalische Phosphatase (AP, Boehringer Mannheim)

Der Übernachtverdau von 60 µl wurde mit 20 µl Dephosphorylierungspuffer und 2 µl AP auf 120 µl mit DDW aufgefüllt, gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase sowie die Restriktionsenzyme wurden durch die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion inaktiviert.

2.3.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Zusammenführung von Enden zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente, die mit gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden und kann z.B. DNA-Fragmente in geöffnete linearisierte Zielplasmide insertieren und das Plasmid zirkulieren.

Lösungen: Ligationspuffer (660 mM Tris-HCL, 50 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythrol, 10 mM ATP, pH 7.5), T4-Ligase (Boehringer Mannheim).

10 ng gereinigter Vektor-DNA und 10-100 ng gereinigter Insert-DNA wurden mit Ligasepuffer und 1 µL T4-Ligase vermischt, mit DDW auf 25 µL aufgefüllt und bei 11 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden kompetente E.coli Bakterien mit 4 µL des Ligationsansatz transformiert.

2.3.1.14 Herstellung elektroporationskompetenter Bakterien

Auf einer Tetrazyklin-haltigen LB-Agarplatte (12.5 µg/ml) wurden Zellen des E.coli-Stammes XL1-MRF ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 50 ml LB-Medium wurden mit einem Bakterienklon beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zum Animpfen von 1 l LB-Medium wurden 10 ml dieser Vorkultur verwendet. Man ließ die Zellen 3-5 h bei 37°C schüttelnd wachsen (250 rpm/min) und kontrollierte gegen Ende der Inkubation die Absorption der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (3.4). Die optimale Wachstumsphase ist erreicht, wenn die Absorption 0.6-0.7 beträgt. Die Zellen wurden durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4000 x g bei 4°C geerntet, der Überstand soweit wie möglich entfernt und das Zellpellet in 1 l eiskalter 10% Glycerol-Lösung resuspendiert. Die Bakterien wurden bei allen weiteren Schritten auf Eis gehalten, um eine Reduktion der Transformationseffizienz zu vermeiden. In den nachfolgenden Waschschritten mit 10%igem Glycerol wurden die Salzurückstände aus dem Zellpellet entfernt, die sich bei der Elektroporation möglicherweise störend auswirken könnten. Das Volumen der in Glycerol gelösten Bakterien wurde durch drei weitere Zentrifugationen von 0.5 l, auf 0.25 l und schließlich auf ein Endvolumen von 4 ml verringert. Bakterienaliquots von 40 µL wurden anschließend bei -80°C eingefroren.

2.3.1.15 Elektrotransformation von Bakterien

Für die Elektroporation von Ligationsansätzen wurden Verdünnungen von 1:4 und von gereinigter DNA von 1:300 in TE angesetzt. 40 µL der kompetenten Zellen wurden auf Eis angetaut, mit 4 µL der DNA-Verdünnung gemischt und für 1 min auf Eis gestellt. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine gekühlte Küvette gegeben und einer Spannung von 1.8 kV ausgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium überführt und für 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension für den Ligationsansatz (3.2.3) wurde 5 min bei 4000 rpm/min und bei RT zentrifugiert, das Zellpelett in etwa 100 µL des Überstandes resuspendiert, auf eine LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension der Minipräparations-DNA wurde nach 1 h Inkubationszeit auf 5 ml LB-Medium aufgefüllt, mit Ampicillin (1 µL/ml) versetzt und weitere 4 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100 µL dieser Vorkultur wurden zum Animpfen von 500 ml LB-Medium verwendet.

2.3.1.16 Konzentrationsbestimmung von DNA

In einem Spektrophotometer wurde die Konzentration von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA in Lösung durch die Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt (Maniatis et al., 1982): DNA-Konzentration für doppelsträngige DNA = $A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL}$, DNA-Konzentration für einzelsträngige DNA = $A_{260} \times 36 \mu\text{g/mL}$.

2.3.1.17 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen wurden unter Einsatz eines ABI 394 DNA/RNA Synthetisierer von Herrn Fritz Benseler und Frau Ivonne Thanhäuser am Max Planck Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, durchgeführt oder an die Fa. GATC, Konstanz geschickt.

2.3.1.18 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen: TAE (50-fach): 2 M Tris, 50 mM EDTA, 4 % Essigsäure, pH 8.5; Ladepuffer (10-fach): 57 % Glycerin, 100 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1 kB DNA Längenmarker (Endkonzentration von 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Firma Gibco).

Für das Gel wurden 0.8% (w/v) Agarose mit 1x TAE-Puffer durch Aufkochen schlierenfrei gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wurde Ethidiumbromid (1/10.000) zugesetzt, gemischt und in eine Flachbett-Elektrophoresekammer blasenfrei gegossen. Die aufzutragenden Proben wurden mit Ladepuffer (1/10) versetzt, in die Gelkammern pipettiert und bei einer Spannung von 80 -120 V bis zur gewünschten Laufstrecke aufgetrennt. Der mitgeführten DNA-Längenmarker markierte in der nachfolgenden UV-Detektion (Geldokumentation) die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente.

2.3.2 Zellbiologische Methoden

Die Zellbiologischen Methoden dienen zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen für biochemische Bindungsstudien *in vitro*, für den Nachweis, dass diese Proteine die Zelloberfläche erreichen können (*cell surface labeling*) oder für Bindungsstudien an lebenden Zellen (*live cell labeling*).

Allgemeine Lösungen:

DMEM: DMEM Medium: 500 mL Dulbecos Mod. Eagle medium mit 4.5 g/L Glukose (Gibco, #41965-039) mit 50 mL Kälberserum (FBS, Invitrogen) und 5 mL (Penizillin und Streptomycin-Lösung, Gibco #15140-106).

PBS: *phosphate-bi-saline buffer* aus NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (Gibco, # 14190-094).

2.3.2.1 Erhaltung einer COS-7 Zellkultur (*thawing, splitting, freezing*)

Lösungen: Gefriermedium (2-fach): 40% DMEM, 20% DMSO, 40% FBS

Ein in flüssigem Stickstoff eingefrorenes 1 mL Aliquot einer COS-7 Zellkultur wurde im Wasserbad bei 37°C schnell angetaut und zu 9 mL DMEM-Medium gegeben und für 3 min bei 800 g bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mL DMEM aufgenommen und in eine 10 cm Petrischale (Corning # 430167) pipettiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einem Tag wurde das Medium erneuert und die Kultur für weitere 2 Tage inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Zur Verteilung der COS-7 Zellen auf mehrere Petrischalen, wurde die Zellen mit PBS durch Überspülung gewaschen und mit 2 mL 0.25% Trypsin-Lösung (mit 1 mM EDTA, Gibco, # 25200-056) von der Petrischalen gelöst und mit mindestens 4 mL Medium verdünnt. Die erhaltene Verdünnung wurde auf fünf neue Petrischalen verteilt und wieder mit einem Gesamtvolumen von 10 mL pro Petrischale inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Für die Erstellung einer neuen Lagerkultur wurden die Zellen wiederum mit Trypsin von den Petrischalen gelöst und zu 4 mL DMEM gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min mit 800 g bei RT) und in 1 mL aus 500µL DMEM und 500µL Gefriermedium resuspendiert und übernacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag konnte die gefrorene Zellkultur zur Lagerung in flüssigem Stickstoff transferiert werden.

2.3.2.2 Transfektion von COS-7 Zellen nach der DEAE-Methode

Diese Transfektionsmethode nutzt die positive Ladung des Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextrans, um die negativen Oberflächen der zu transfizierenden Plasmid-DNA und der COS-7 Zellen zu verbinden, so dass die DNA über Endozytose aufgenommen werden kann. Das später zugesetzte Chloroquin unterbindet den Abbau der aufgenommenen DNA in der Zelle und erhöht dadurch die Transfektionsrate (Luthman und Magnusson, 1983).

Lösungen: TBS-Puffer (2-fach): 28 mL 5M NaCl, 3 ml 1M KCl, 1 mL 1M CaCl₂, 0.5 mL 1M MgCl₂, 4.5 mL 200 mM Na₂HPO₄, pH7.4, 20 mL 1M Tris-HCl, pH 7.9 add 500 mL; DEAE-Lösung: 5 mg/mL DEAE Dextran MW 500k (Amersham, #17-0350-01) in DDW; Chloroquine-Lösung: 10 mM Chloroquine (Sigma, #C6628) in DDW.

Für eine Petrischale (ø 10 cm) wurden 1.65 mL TBS, 1.25 mL DDW, 66 µL Plasmid-DNA (0.1 µg/µL) und 330 µL DEAE gemischt. Am 1. Tag nach dem *splitting* wurden die COS-7 Zellen zweimal mit 6 mL einfach-konzentriertem TBS gewaschen, bevor 3.3 mL der DNA/DEAE Mischung zugegeben und sie für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 10 mL frisches DMEM Medium und 100 µM Chloroquine-Lösung überschichtet und für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium gegen Chloroquin-freies ausgetauscht und die Zellen für 2-3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am ersten Tag nach der Transfektion von DNA von IgG-Fusionsproteinen wurden das Medium gegen ein FBS-freies DMEM ausgetauscht, wodurch eine Kontamination durch Rinderserumantikörpern bei der nachfolgenden

Immunopräzipitation durch Protein A verhindert wurde.

2.3.2.3 Herstellung von COS-7 Zell-Lysaten

Lösungen: Lysepuffer: 1% Triton X100, 50 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, pH 8.0

Die COS-7 Zellen wurden drei Tage nach ihrer Transfektion mit PBS oder für spätere Calcium-sensitive Bindungsstudien mit TBS gewaschen und mit 300 µL Lysepuffer von der Petrischale geschabt (*scraping*) und 30 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (10 min mit 12 000 g bei 4°C) und der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2.4 Gewinnung von COS-7 Medien mit sekretierten löslichen IgG-Fusionsproteinen

Der Medienüberstand zwei bis drei Tage alter transfizierter COS-7 Zellkulturen wurde in 15 mL Gefäße (Falcon) überführt, in denen 10 µL 1 M Tris-HCl, pH 8.0 vorgelegt war. Die Lösung wurde zur Entfernung von Zelldebris abzentrifugiert (3 min mit 800 g bei RT), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und dieses in flüssigem Stickstoff zur Lagerung bei -80°C schockgefroren.

2.3.2.5 Oberflächenmarkierung lebender Zellen (*live cell labeling*)

Lösungen: Elutionspuffer (E-Puffer): 100 mM Glycin/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 2.7.

Für das *live cell labeling* wurden die an Protein A immobilisierten IgG Fusionsproteine mit E-Puffer eluiert. Nach Elution musste der pH mit 1 M Tris pH 8.0 wieder auf 7.5 eingestellt werden. Lösliche Neurexin LNS-IgG Fusionsproteine wurden mit Neurologin-GFP (Nlgn-A-GFP, Dresbach et al., 2006) produzierenden tsA201 Zellen (ECACC), die auf Deckgläschen gewachsen waren, in Anwesenheit von 2 mM CaCl₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM CaCl₂ gewaschen und die an die Zelloberfläche gebundenen Fusionsproteine wurden mit Protein A-konjugiertem Alexa546 (Molecular Probes) visualisiert. Wildtyp und mutierte Proteine von Nlgn und EGFP-Nrxn 1β (IENB) wurden ebenfalls in tsA201 exprimiert und für 48 Std. inkubiert. Die Zelloberfläche oder die ganze Zelle wurden mit anti-Nlgn Antikörper markiert. Die Ergebnisse wurden mit einem Axioskop 2 (Zeiss) Epifluoreszenz und einem TCS SP2 (Leica) konfokalen Mikroskop dargestellt.

2.3.3 Proteinbiochemische Methoden

Die aus COS-7 Zell-Überständen gewonnen rekombinanten IgG-Fusionsproteine wurden im *Batch*-Verfahren an ein Protein A-Kügelchen (*beads*) gebunden, gewaschen und für die Präzipitation (*pull-down*) von Bindungspartnern aus Hirnlysaten oder COS-7 Zell-Lysaten genutzt. Die an die *beads* gebundenen Proteinkomplexe wurden gewaschen, mit SDS von den *beads* gelöst und über eine SDS-PAGE (2.3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)) aufgetrennt.

2.3.3.1 Herstellung von Tierhirnlysaten

Lösungen: Homogenisationspuffer (H-Puffer): 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 0.1 g/L PMSF; Lysepuffer (L-Puffer, 2-fach): H-Puffer, 2% Triton X-100.

Das frisch präparierte oder bei –80°C gelagerte Endhirn von 6-12 Wochen alten Mäusen oder Ratten wurde in 2 mL H-Puffer gelegt und auf Eis mit einem Polytron-Homogisator mit 22000 U/min mit acht kurzen Stößen homogenisiert. Nach Zugabe von 2 mL L-Puffer wurde das Homogenat für 1 Stunde bei 4°C unter Rotation lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (30 min mit 220000 g bei 4°C) und der Überstand sofort weiterwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren ehe es bei –80°C gelagert wurde.

2.3.3.2 Immunopräzipitation (*pulldown*) von IgG-Fusionsproteinen mit Protein A

Lösungen: Bindungspuffer (B-Puffer): 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5; Calcium-freier Bindungspuffer (C-Puffer): 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5; Calcium-freier Lysepuffer (L-Puffer): 50 mM Tris/HCl, 80 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.5.

Die in COS-7 Medienüberständen sekretierten IgG-Fusionsproteine wurden an B-Puffer equilibrierte Protein A-*beads* gebunden (1 Stunde unter Rotation bei 4°C), abzentrifugiert (10 min mit 4000 g bei 4°C) und durch dreimalige Zentrifugation (30 s, 12000 g, 4°C) und Resuspension (B-Puffer, 5 min, 4°C) gewaschen. 100 µL an Protein A gebundene und mit B-Puffer gereinigte IgG-Fusionsproteine wurden in B-Puffer mit 300 µL COS-7 Lysat oder 1 mL Hirnlysate versetzt. Für die Verwendung von Hirnlysaten enthielt Puffer-B zusätzlich 0.1% Triton X-100. Weiterhin wurden Maushirnlysate wegen der späteren Verwendung des Antikörpers 4C12 (aus Maus) vorab mit ungebundenen Protein A-*beads* vorinkubiert (30 min, 4°C) und die *beads* abzentrifugiert (30 s, 12000 g, *pre-clearance* von Maus IgG). Die Inkubationszeit des *pulldown* betrug 2 Stunden. Die an die *beads* -gebundenen Proteinkomplexe wurden dreimal durch Zentrifugation (30 s, 12000 g, 4°C) und Resuspension (B-Puffer, 5 min, 4°C) gewaschen, bevor sie über eine SDS-PAGE analysiert wurden.

Die Analyse der Calciumabhängigkeit der Neurexin/Neurologin bindung erforderte, dass alle COS-Zell-Lysate mit Phosphat- und Calcium-freien L-Puffer hergestellt wurden. Die ebenfalls Calcium-freien C-Puffer gereinigten und immobilisierten LNS-IgG Fusionsproteine wurden mit diesen transfizierten COS-7 Zell-Lysaten versetzt und wie oben nach Zusatz verschiedener Konzentrationen von freiem Ca²⁺ inkubiert. Die Berechnung der freien Calciumkonzentration erfolgte mit MaxChelator (C. Patton, Stanford University) und wurde nach dem CaCl₂/EDTA-System eingestellt (Bers, 1982).

2.3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Vertikalgel, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel.

Lösungen: Trennpuffer (4-fach): 1.5 M Tris, pH 8.8 0.4 % SDS; Sammelpuffer (4-fach): 0.5 M Tris, pH 6.8, 0.4 % SDS; Laufpuffer (10-fach): 0.25 M Tris, 1.9 M Glycerin, pH 8.8, 1% SDS; Färbelösung: 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0.05 % Coomassie; Entfärber: 10% Essigsäure; Probenpuffer (2-fach): Sammelpuffer (4-fach), pH 6.8.

Die Komponenten des Trenngels wurden in den angegebenen Mengen gemischt und bis ca. 4 cm unterhalb des oberen Randes der Glasplatten gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit H₂O gesättigtem n-Butanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Nach ca. 1 h war das Gel polymerisiert. Danach wurde das Butanol entfernt und mehrfach mit Wasser gespült. Das Sammelgel wurde gemischt, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit dem doppelten Volumen Probenpuffer gemischt und 3 min lang aufgekocht. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Glasplatten in eine vertikale Gelapparatur (Mini-Protean, BioRad) mit 1x Laufpuffer gespannt. Die vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Für den Lauf der Proben durch das Sammelgel wurden 80 V und durch das Trenngel 100-120 V angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Laufmittelfront aus dem Trenngel herauslief. Das Trenngel wurde entweder weiter für Western-Blotting oder für Coomassie-Färbung verwendet. Hierfür wurde das Gel für 15 min in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend durch mehrstündiges Schütteln in der Entfärberlösung von überflüssigem Farbstoff befreit und in Wasser gewaschen.

2.3.3.4 Proteintransfer auf Nitrocellulosepapier

Die Nitrocellulose (NC)-Papier war ursprünglich als Sterilfilter konzipiert worden ehe man entdeckte, dass Proteine vollständig haften blieben. Mit einem elektrischen Feld können Proteinen von Polyacrylamidgelen auf das NC-Papier transferiert werden (*blotting*).

Lösungen: Transfer-Puffer: 0.025 M Tris, 0.19 M Glycerin, 20% Methanol; Färbelösung: 5% Essigsäure, 0.2% Ponceau-S; PBS-Tween: 0.005% Tween 20 in PBS.

Das NC- und zwei Whatman-Papiere wurden auf die Größe des Trenngels geschnitten. Eine Stunde vor dem Transfer wurde die zugeschnittene NC-Papier in Wasser eingeweicht. Die verschiedenen Schichten wurden in einer Transferkassette in folgender Reihenfolge aufeinander gelegt: ein Transferschwamm, ein Whatman-Papier, das Gel, die Membran, ein Whatman-Papier und zuletzt ein Transferschwamm. Die Transferkassette wurde luftblasenfrei geschlossen und in eine Transferkammer gesetzt, sodass eine Übertragung der Proteine von

Anode zu Kathode statt finden konnte. Die Transferkammer, in welche zuvor noch ein Eisblock platziert wurde, wurde mit eiskaltem Transferpuffer aufgefüllt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde bei konstanten 250 mA für 2-2 1/2 h durchgeführt.

2.3.3.5 Nachweis von gebundenen Proteinen auf Nitrocellulosepapier durch Ponceau S Färbung und Markierung durch Antikörper

Lösungen: Ponceau S, PBS-Tween: 0.005% Tween 20; Blockierungspuffer (I-Puffer): 5% Magermilchpulver, 5% NGS in PBS-Tween; ECL-System: Reagenz A; Reagenz B; Entwicklerlösung; Fixiererlösung;

Der Nachweis von bestimmten Proteinen (auf NC-Papier gebunden) wurde durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion möglich. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop des gesuchten Proteins. Ein sekundärer Antikörper, welcher mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, erkennt spezifisch den Fc-Teil des primären Antikörpers. Eine Peroxidase katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol, welches in einem angeregten Zustand blaues Licht emittiert, bevor es in den Ausgangszustand zurück fällt. Die Chemilumineszenz kann durch die Exposition auf einem speziellen Film sichtbar gemacht werden.

Nach dem Transfer wurde das Gel für 0.5 min mit Ponceau S inkubiert, um den Transfer der Proteinbanden zu kontrollieren und die aufgetragenen Proteinmengen zu dokumentieren. Das Gel wurde kurz mit Wasser und dann mit PBS-Tween entfärbt. Daraufhin wurde das NC-Papier 30 min im I-Puffer schüttelnd bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren. Anschließend der primäre Antikörper über Nacht bei 4°C schüttelnd in frischem I-Puffer inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Papier dreimal für jeweils 5 min mit PBS-Tween gewaschen, der sekundäre Antikörper in I-Puffer zugesetzt und für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Danach wurde das Papier abermals für dreimal 15 min mit PBS-Tween gewaschen. Die Reagenzien A und B wurden in gleichen Mengen vermischt, auf das NC-Papier gegeben und für 1 min inkubiert. In der Dunkelkammer wurde ein lichtempfindlicher Film auf das durch Transparentfolie geschützte NC-Papier gelegt exponiert. Der Film wurde 2-3 min in die Entwicklerlösung gelegt, für 30 sec in Wasser gespült, 10 min in der Fixierlösung belassen, abermals 10 min in Wasser gespült und getrocknet.

2.3.3.6 Bindung von Calcium-45 an Nitrocellulose-gebundene Proteine

Lösungen: Elutionspuffer (E-Puffer): 0.1 M glycine, 0.15 M NaCl pH 2.7; Waschpuffer (W-Puffer): 50 mM Tris, 0.15 M NaCl pH 7.5; Calciumpuffer (C-Puffer): 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris, 0.15 M NaCl pH 7.5.

Gereinigte Nrxn LNS-IgG Fusionsproteine wurden von Protein A-beads mit E-Puffer eluiert und die Überstände nach Zentrifugation (10 min mit 12000 g bei 4°C) wurden 1 M Tris/HCl auf pH 7.5 eingestellt und auf NC-Papier mit Hilfe des Dot Blot 96 Systems (Whatman/

Biometra) aufgetragen (*western dot blot*). Jede Probe wurde mit Ca^{2+} -freiem W-Puffer gewaschen und nachfolgend mit 30 μCi Calcium-45 Chlorid (Perkin Elmer) für 30 min inkubiert. Das NC-Papier wurde mit nicht-aktivem C-Puffer gewaschen und die erfolgte Calcium-45 Bindung wurde mit einem Phospho-Imager (Fuji FLA-3000) detektiert.

2.3.4 Bioinformatische Methoden

Für die Strukturmodellierung von Gesamtlängenproteinen wurde deren Aminosäuresequenz vorab in Domänen und kleinere Fragmente unterteilt. Die UniProtKB Datenbank (Kap. 2.3.4.1) lieferte erste Hinweise für eine Einteilung. Mittels BLAST und HCA Analysen konnten die Angaben validiert und erweitert werden. Wurden für Fragmente sequenzähnliche Strukturen in der Proteindatenbank (PDB) gefunden, so konnte eine Homologiemodellierung durchgeführt werden (Kap. 2.3.4.2). Andernfalls wurden die Methoden *blast2model* und *threading* angewandt und kurze 20-50 Reste lange Strukturmodelle erhalten (Kap. 2.3.4.5, 2.3.4.8). Diese Strukturfragmente und Domänen wurden unter Berücksichtigung experimenteller Daten zusammengefügt. Fehlten jegliche Strukturinformationen, so wurden die Fragmente so angeordnet, dass (i) eine höchst kompakte und (ii) eine am weitesten gestreckte Struktur erhalten wurde. Beim Zusammenbau der Gesamtstruktur wurden *docking*-Verfahren eingesetzt (Kap. 2.3.4.1, 2.3.4.5), um Lösungen für die Anordnung von Domänen in Multidomänproteinen zu erhalten oder experimentell indizierte Komplexmodelle an der Kontaktstelle zu optimieren. Jede Modellierung wurde mit einer Qualitätsanalyse der Strukturmodelle abgeschlossen (Kap. 2.3.4.12).

Auf die erhaltenen Modelle wurden experimentelle und theoretische Befunde kartiert, die eine Validation der Daten erlaubten. Hiernach konnten neue Ansätze für Experimente abgeleitet oder eine Verfeinerung der Strukturmodelle erfolgen.

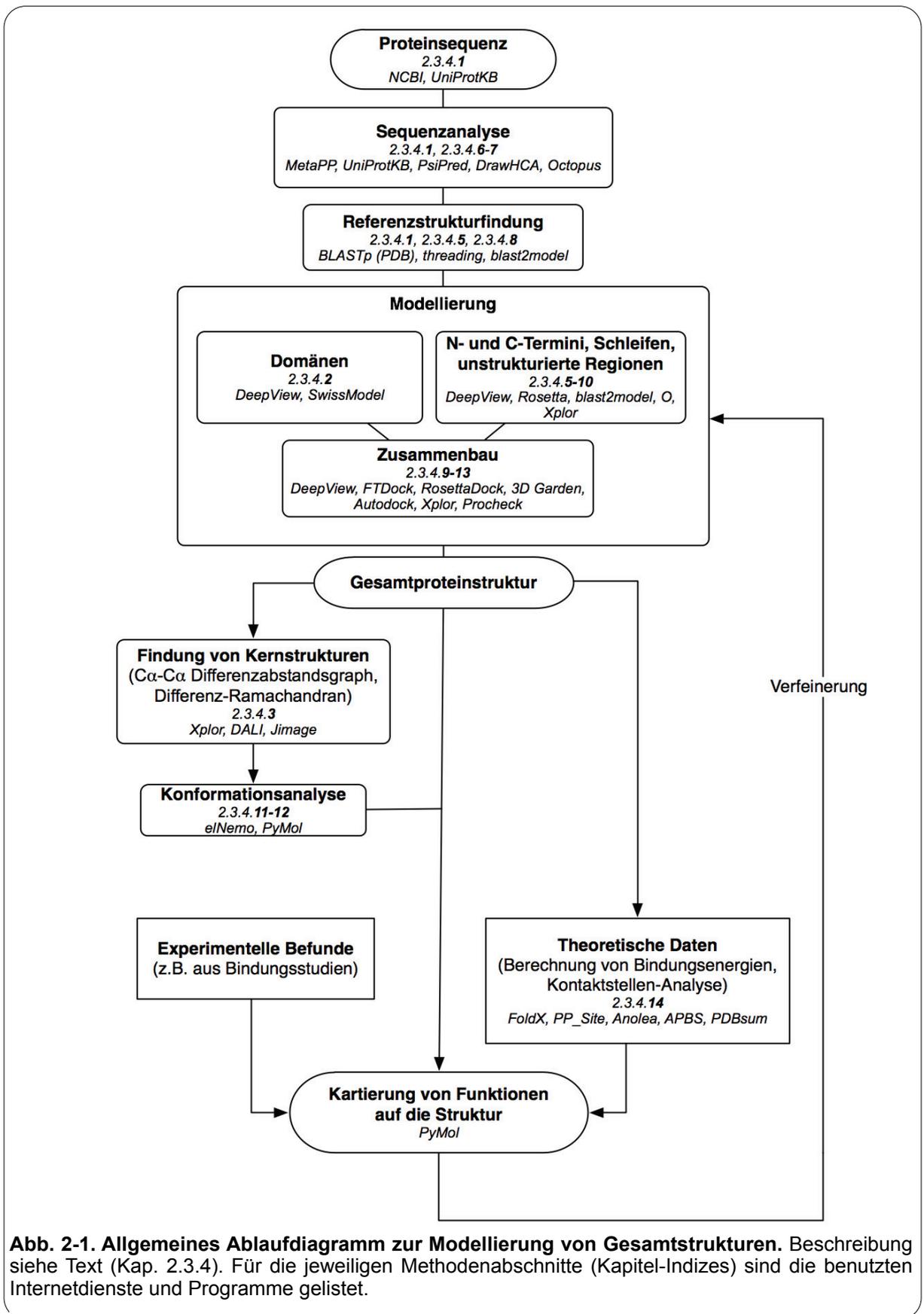


Abb. 2-1. Allgemeines Ablaufdiagramm zur Modellierung von Gesamtstrukturen. Beschreibung siehe Text (Kap. 2.3.4). Für die jeweiligen Methodenabschnitte (Kapitel-Indizes) sind die benutzten Internetdienste und Programme gelistet.

2.3.4.1 Benutzte Internet-Dienste und Programme

Service	Methode	Kap.	URL
3D Garden	Komplexbildung, Konformationsraumanalyse	2.3.4.10	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dgarden/index.cgi
Anolea	Kontaktflächenfindung, Qualitätsanalyse	2.3.4.11	http://swissmodel.expasy.org/anolea/
Dali	Vergleich von Kernstrukturen	2.3.4.4	http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/
DrawHCA	Hydrophobe Clusteranalyse, Domänenfindung	2.3.4.7	http://smi.snv.jussieu.fr/hca/hca-form.html
eINemo	Konformationsanalyse	2.3.4.11	http://www.igs.cnrs-mrs.fr/elnemo/start.html
FoldX	Freie Energie ΔG Berechnung. Alanin-Scan.	2.3.4.14	http://foldx.crg.es/
HCA	Domänenfindung	2.3.4.7	http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi
MetaPP	Datensammlung	2.3.4.5	http://www.predictprotein.org
PDBSum	Kontaktstellenanalyse	2.3.4.14	http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/
PsiPred	Sekundärstruktur		http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
Rosetta	ab initio Modellierung	2.3.4.5	http://www.bioinfo.rpi.edu/~bystrc/hmmstr/server.php
SwissModel	Schleifenbildung	2.3.4.10	http://swissmodel.expasy.org/
UniProtKB	Primärsequenz	2.3.4	http://beta.uniprot.org/
ZDock	Komplexbildung, Konformationsraumanalyse	2.3.4.10	http://zdock.bu.edu/

Software	Methode	Kap.	URL
APBS	Oberflächenbildung	2.3.4.10-11	http://apbs.sourceforge.net/
BioEdit	Sequenzalignierungen	2.3.4	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/
blast2model	Gesamtproteinmodellierung	2.3.4.8	http://dunbrack.fccc.edu/
CNS (ersetzt X-Plor)	Positionsverfeinerung, Energiminimierung, C α -C α -Abstandsdiagramm	2.3.4.2-3	http://cns-online.org; http://xplor.csb.yale.edu
DeepView (SwissPDB Viewer)	Strukturmodellierung	2.3.4.2-14	http://spdbv.vital-it.ch/
FoldX	Freie Energie ΔG Berechnung. Alanin-Scan.	2.3.4.14	http://foldx.crg.es/
ImageJ	Darstellung von C α -C α -Abstandsdiagrammen	2.3.4.3	http://rsbweb.nih.gov/ij/
MGL Tools	Oberflächenbildung, <i>docking</i>	2.3.4.10, 2.3.4.13	http://mgltools.scripps.edu/
O	Schleifenbildung	2.3.4.10	http://xray.bmc.uu.se/usf/ http://xray.bmc.uu.se/~alwyn/
Octopus	Hydrophobe Clusteranalyse, Domänenfindung	2.3.4.7	http://www.korilog.com/
PP_Site	Kontaktstellenanalyse	2.3.4.10-11	http://mdl.ipc.pku.edu.cn/
Procheck	Qualitätsanalyse	2.3.4.12	http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html
PyMol	Visualisierung, Animationen	2.3.4.2-14	http://www.pymol.org

2.3.4.2 Modellierung von strukturhomologen Proteinsequenzen

Gesamtlängen Proteine oder Domänen mit einer Sequenzidentität von mehr als 20% zu Strukturen in der PDB wurden mit dem Programm SwissPDB Viewer und SwissModell (Guex und Peitsch, 1997) modelliert. Wenn nötig wurden die Schleifenregionen mit Hilfe der integrierten LoopDB Datenbank manuell angepasst. Alle nicht zur Referenzstruktur homologen Reste wurden mit dem SwissPDB Viewer oder Xplor (Brunger, 1988) positionsverfeinert und energieminiert, während die Koordinaten der homologen Reste nicht verändert wurden (*constrained coordinates*). Für die Erstellung eines Datensatzes eines Proteins in verschiedenen Konformationen (wie CaM) wurde das blast2model Verfahren (2.3.4.8) angewandt. Mit der homologen Proteinsequenz wurde ein BLAST gegen die PDB durchgeführt und über blast2model die verschiedenen konformierten Referenzstrukturen mit der neuen Sequenz versehen.

2.3.4.3 Bestimmung von Kernstrukturen und Subdomänen von Proteindomänen.

Für den strukturellen Vergleich mehrerer Proteine wurden ein oder mehrere Topologiemotive gesucht, welche in diesen Proteinen nahezu identisch gefaltet sind (R.M.S.D. < 1.5Å). Diese Kernstrukturen (*core structures*) konnten aus einer oder mehreren Peptidketten aufgebaut sein. Die Kernstrukturen wurden mit Hilfe eines Differenzabstandsdiagramms und aus der Berechnung der Differenzdihederwinkel bestimmt. Beide Methoden sind abhängig von der direkten Zuordnung von C α Positionen in zwei unterschiedlichen Proteinen, aber unabhängig von der Aminosäuresequenz (*sequence alignment*) oder der Faltung (*structural alignment*). Für das Differenzabstandsdiagramm wurden vorerst die internen Abstände aller C α Atome für jede einzelne der zu vergleichenden Proteinstrukturen A und B errechnet und nachfolgend die Differenz der Internen Abstände ΔD zwischen zwei Proteinstrukturen gebildet: $\Delta D = |(C\alpha A_n - C\alpha A_m) - (C\alpha B_n - C\alpha B_m)|$. Die Beträge der Differenzdihederwinkel ΔPSI und ΔPHI zwischen zwei Strukturen wurden wie folgt errechnet: $\Delta PSI = |PSI(A) - PSI(B)|$; $\Delta PHI = |PHI(A) - PHI(B)|$. Die erhaltene Differenzabstandsmatrix $M(\Delta D)$ wurde mit dem Programm ImageJ für die Grenzbereiche von 0 Å bis 8 Å im Regenbogenfarbmuster von blau nach rot dargestellt, während die Differenzdihederwinkel als Funktion der C α Position für den Bereich von 0 bis 180 Grad dargestellt wurden. Für diese Berechnungsmethode war es erforderlich, daß die zu vergleichenden Proteine die gleiche Sequenzlänge aufwiesen. Zum Vergleich verschieden großer Proteine (z. B. Recoverin und Vilip-1 oder AchE und Neuroligin) wurde durch eine vorab durchgeführte Strukturelle Alignierung eine für beide Proteine gemeinsame Sequenzlänge und Aminosäurezuordnung ermittelt. Etwaige Sequenzinsertionen oder -deletionen in beiden Proteinen wurden entfernt. Mit Hilfe des Differenzabstandsdiagramms und der Differenzdihederwinkel konnte die getroffene Strukturelle Alignierung überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden. Die Kernstruktureinheiten (*cores*) entsprachen in der Regel einer konservierten hydrophoben Proteinfaltungseinheit (*hydrophobic folding unit*, HFU). Die Sequenzgrenzen

einer Domäne wurden nahe der Kernstruktureinheit gewählt und für jedes Protein individuell definiert. Die angewandten Kriterien und genauen Domänengrenzen werden bei den jeweiligen Klonierungsmethoden beschrieben.

2.3.4.4 Klassifikation der Kernstrukturen durch den Vergleich mit bekannten Strukturen

Mit Hilfe der Kernstrukturen konnten strukturelle Beziehungen zu anderen bekannten Proteinstrukturfamilien hergestellt werden. Hierzu wird eine PDB Datei der Kernstruktur an den DALI Server (Holm und Sander, 1996) gesandt, der mit diesem Fragment eine paarweise Superposition mit allen Strukturen in der PDB durchführte.

2.3.4.5 Modellierung von nicht strukturhomologen Proteinsequenzen

Für Proteinsequenzen, die keine Homologie zu bekannten Domänen aufwiesen, wurden über den MetaPP Server (Kap. 2.3.4.1) umfangreiche Informationen gesammelt und eine hydrophobe Cluster Analyse (HCA, Kap. 2.3.4.7) durchgeführt, um Sequenzabschnitte in potentielle Domänen einzuteilen. Nachfolgend wurden auf die Sequenzabschnitte *threading*-Verfahren (GDT, *threader*, Kap. 2.3.4.1) angewandt, um ihnen geeignete Faltungseinheiten aus bekannten Proteinstrukturen zuzuordnen. Sequenzbereiche, für die sich keine Lösung in *threading*-Verfahren finden lies, wurden entsprechend der erhaltenen Alignierungen nach einer BLAST-Suche (Kap. 2.3.4.1) gegen Sequenzen der Proteindatenbank (PDB) modelliert (Blast2model, Kap. 2.3.4.8).

2.3.4.6 Bestimmung und Modellierung der Sekundärstruktur

Die Vorhersage der Sekundärstruktur erfolgte über dem Internetdienst PSIPRED (Kap. 2.3.4.1), für den eine Richtigkeit von über 70% angegeben wurde (Jones, 1999). Bei der *ab initio* Modellierung wurden die von dort erhaltenen Sekundärstrukturinformation in 3D mit dem Programm SwissPDb Viewer modelliert. Anhand der Muster von hydrophoben Resten auf den Sekundärstrukturelementen konnten erste Hinweise auf Bindungsstellen gewonnen werden.

2.3.4.7 Hydrophobe Cluster Analyse (HCA)

In löslichen Proteinen bilden hydrophobe Reste Cluster aus, die sich innerhalb des Proteins befinden und die Sekundärstrukturelemente miteinander verknüpfen. Gleichzeitig sind lange hydrophobe Seitenketten maßgeblich für die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen verantwortlich. Demgemäß liefert die Analyse der Verteilung von hydrophoben Resten auf Sekundärstrukturelementen erste Hinweise auf die Domänengrenzen von Multidomänproteinen oder von hydrophoben Bindungsstellen von EF Hand Proteinen. Für die Analyse wurde das Program Octopus (Durand und Mornon, 1998) oder der Internetdienst DrawHCA (Kap. 2.3.4.1, Gaboriaud et al., 1987) genutzt. Das Programm Octopus erlaubte eine HCA Analyse von BLAST Ergebnissen. Hierbei wurden konservierte Verteilungsmuster innerhalb einer Proteinfamilie als Domänenabschnitte deklariert. Für Bindungsstudien mit Peptidfragmenten wurden diese so gewählt, dass die konservierten hydrophoben cluster im Fragment erhalten blieben.

2.3.4.8 Automatische Proteinmodellierung nach einem Sequenzvergleich

Das Blast2model-Verfahren (Sauder, 1999) erlaubte die automatische Modellierung einer beliebigen Proteinsequenz anhand der Alignierung nach einem BLAST gegen Sequenzen aus der Proteindatenbank (PDB, (Berman et al., 2000)). Der BLAST wurde manuell am NCBI-Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) vorgenommen und die erhaltene HTML Seite als Textdatei gesichert. Das Perl-Script *blast2model.pl* las diese Datei ein, holte entsprechend den BLAST-Alignierungen die PDB Dateien von der PDB (<http://www.pdb.org>), reduzierte diese auf die zur Alignierung passenden C α -Atome und benannte die Namen der Reste entsprechend der gesuchten Sequenz um. Die Atome von Resten, die in Modell und Referenzstruktur identisch waren, blieben in den erzeugten PDB Dateien erhalten. Das Perl-Script wurde hier angepasst, so dass von diesen fragmentierten PDB Dateien mit Hilfe von Rasmol (<http://www.rasmol.org/>) automatisch mehrere Bilder aus 90° verschiedenen Blickwinkeln generiert wurden und diese nachfolgend zu einem Quicktime-Film zusammengefasst werden konnten. Der Film erlaubte die schnelle Findung geeigneter Faltungsfragmente, die in nachfolgenden Modellbau-Verfahren zu einer Domäne zusammengefasst wurden. Mit Hilfe von *blast2model* liessen sich weiterhin automatisch die sequenzhomologen Strukturfragmente einer ganzen Proteinfamilie modellieren.

2.3.4.9 Modellbau von Proteinen mit vollständiger Proteinsequenz

Die Proteindatenbank enthält hauptsächlich die Strukturen von Domänen und Domänenkomplexen und nur wenige Strukturen von Gesamtlängen Proteinen. Oft sind aufgrund fehlender Elektronendichte die Koordinaten von variable konformierten Schleifenregionen wie die N- und C-Termini oder z.B. die HOOK-Region von PSD-95 nicht vorhanden. Da diese Regionen aber auch wichtige Bindungstellen enthalten können, mussten sie modelliert werden. Als Validitätskriterium diente im Wesentlichen nur das Ramachandrandiagramm, welches dafür sorgte, dass die gewählten Koordinaten in erlaubten Psi und Phi Regionen lagen. Waren die zu modellierenden Abschnitte länger als 10 Aminosäuren, so wurde vorerst die Sekundärstrukturfaltung via PSIPRED und nachfolgend die Vorhersage der Tertiärfaltung via *threading* Verfahren (GDT, Threader) und dem Rosetta-Server geprüft. Für längere nicht-homologe Sequenzen (>100 As.) wurde vorerst das *blast2model* Protokoll angewandt und eine HCA-Analyse durchgeführt, um die Sequenz in Abschnitte von ca. 100 As. aufzuteilen und dieses getrennt zu modellieren.

2.3.4.10 Modellbau von Schleifenregionen

Den über *blast2model* oder über Homologie-Modellierung erhaltenen Domänstrukturen fehlten in der Regel die nicht-konservierten Schleifenregionen, die zum Teil auch schon in den Referenzkristallstrukturen wegen ihrer Flexibilität nicht vorhanden waren. Automatische Schleifenbildungsverfahren wie über ROSETTA (<http://www.rosetta.org>), SwissModel (Guex und Peitsch, 1997) oder dem Programm MODELLER (Pieper et al., 2006) schlugen oft fehl. In der Regel konnte ein geeignetes Schleifenmodell in der Datenbank LoopDB des SwissPDB Viewers (Guex und Peitsch) gefunden werden. Für

schwierigere Modellierungen wurde die `loop_fit` Routine des Programms O (Jones, 1998) genutzt. Diese erlaubte die Schleifenbildung durch manuelles Plazieren von C α Atomen im Raum und nachfolgender programmgestützter Vervollständigung der Haupt- und Seitenketten.

2.3.4.11 Konformationsraummodellierung

Das Konformationsraummodell wird aus allen in der PDB bekannten Konformationen einer Proteinfamilie gebildet. Hierzu wurden vorab die Subdomänen innerhalb der Proteinstrukturen bestimmt und alle Gesamtstrukturen der Familie auf eine gemeinsame zentrale Subdomäne mit dem SwissPDB Viewer superpositioniert, so dass alle Strukturen gemeinsame Koordinaten bekamen. Jede Subdomäne wurde unter Erhalt seiner neuen Koordinaten als PDB Datei gesichert. Die Subdomänen wurden unter Anwendung aller Permutationen zur einer vollständigen Proteinstruktur neu kombiniert. Eine Protein mit 3 Subdomänen für das 2 Kristallstrukturen gelöst wurden, in welchen die Subdomänen 1 und 3 unterschiedliche Positionen hatten (jeweils 0 und 1), ergab ein Konformationsraummodell mit insgesamt 4 Modellstrukturen (000, 100, 101, 001). Zum Vergleich lieferte ein *normalmode* Verfahren (Suhre und Sanejouand, 2004) nur die Anfangs- und Endstruktur (000 und 101), da bei der Interpolationroutine (000->101) die Subdomänen 1 und 3 immer gleichzeitig auf die Zielposition bewegt werden. Das *normalmode* Verfahren wurde deshalb erst nach der Bestimmung des Konformationsraummodells und auf jedes mögliche Strukturpaar angewandt (000->001, 000->100, 000->101, 100->101, 001->101). Das lieferte bei dem obigen Beispiel insgesamt 5 verschiedene Konformationsänderungen, die das volle Spektrum des Konformationsraums dieses Proteins darstellten.

2.3.4.12 Animationen von Konformationsänderungen

Für Animationen wurden Intermediärstrukturen seriell so angeordnet, dass vom Anfangs- bis zum Endzustand die geringste Anzahl an Intermediärstrukturen benötigt wurde und sich die Subdomänen in ihrer Bewegungsrichtung nicht sterisch behinderten. Durch das *normal mode* Verfahren eINémo (Suhre und Sanejouand, 2004) konnten weitere Intermediärstrukturen generiert werden, die die nachfolgenden Bewegungsabläufe harmonischer aussehen ließen. Die erhaltenen PDB Dateien wurden in PyMol (DeLano, 2002) geladen und die Konformationsänderungen animiert. Zum Teil war es hilfreich, die Bewegung der Subdomänen in unterschiedlichen Frequenzen ablaufen zu lassen, um die Unabhängigkeit der Bewegungen kenntlich zu machen.

2.3.4.13 Qualitätsanalyse von Modellstrukturen

Die modellierten Gesamtstrukturen konnten mit Hilfe des SwissPDBViewer auf etwaige sterisch nicht erlaubte Kontakte (*clashes*) geprüft und ggf. korrigiert werden. Zur Verfeinerung wurden über den Anolea Dienst energetisch ungünstig plazierte Seitenketten identifiziert und manuell im SwissPDBViewer korrigiert, Abschliessend wurde mit Procheck die geometrischen Eigenschaften der Struktur dokumentiert und mit CompProcheck das Modell mit seiner Referenzstruktur verglichen.

2.3.4.14 Alaninmutationen zur Identifizierung von essentiellen chemischen Oberflächeneigenschaften auf Proteinstrukturen

Für die des Einflussen von Seitenketten auf die Protein- oder Proteinkomplexstabilität wurden Oberflächenreste einer Struktur der PDB oder einer Modellstruktur zu einzeln zu Alanin mutiert und die Änderung der freien Bindungsenergie ($\Delta\Delta G$) gegenüber des ΔG -Werts der unveränderten Struktur (Wildtyp) mit dem Programm FoldX berechnet (*Alanin-Scan*). Zusätzlich wurden auch die Änderungen in den Bindungsenergien für experimentell charakterisierte Einzel- oder Mehrfachmutationen zur Analyse berechnet.

Die Berechnung basiert auf einer empirisch ermittelten Kraftfeld Bibliothek, die die Wechselwirkungskräfte zwischen Atomen in Proteinen enthält. Hieraus lassen sich die spezifischen Freien-Enthalpieterme nach folgender Formel errechnen:

$$\Delta G = a \cdot \Delta G_{\text{vdw}} + b \cdot \Delta G_{\text{solvH}} + c \cdot \Delta G_{\text{solvP}} + d \cdot \Delta G_{\text{wb}} + e \cdot \Delta G_{\text{hbond}} + f \cdot \Delta G_{\text{el}} + g \cdot \Delta G_{\text{kon}} + h \cdot T\Delta S_{\text{mc}} + k \cdot T\Delta S_{\text{sc}} + l \cdot \Delta G_{\text{clash}} \text{ (Schymkowitz et al., 2005).}$$

Positive ΔG Werte weisen auf eine nicht korrekt gefaltete Modellstruktur hin und positive $\Delta\Delta G$ Werte auf denaturierend wirkende oder eine Komplexbildung verhindernde Mutationen hin.

Für die Berechnung der Stabilität von Proteinkomplexen wurde ein Protein als Rezeptor und das andere meist kleinere Protein als Ligand getrennt als PDB Datei gesichert werden, wobei die Reste von Rezeptor und Ligand fortlaufend durchnummeriert sein mussten und keine Kettenbezeichnungen berücksichtigt wurden. In einer weiteren Datei wurden die gewünschten Mutationen mit der neuen Nummerierung (zB. E231A, E231R) eingetragen. Für die Berechnung konnten auch mehrere Mutationen gleichzeitig berücksichtigt werden. Sollten beide Proteine gleichzeitig mutiert werden, so wurden die gewünschten Mutationen am Rezeptor vorerst modelliert und die so veränderte PDB Datei verwendet. Für die Änderung der Nummerierung wurde der SwissPDBViewer eingesetzt.

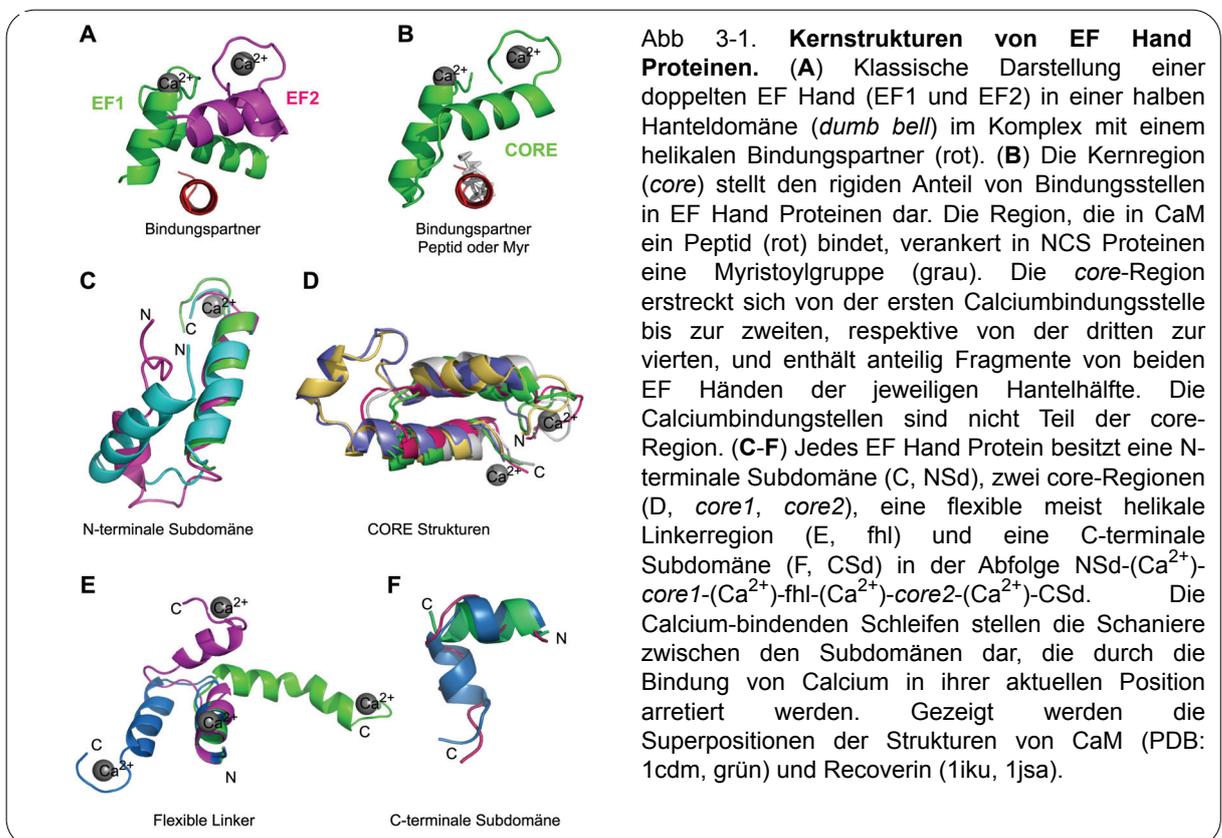
3 Ergebnisse

3.1 Modellanalysen von EF Hand Proteinen zur Vorhersage von Konformationsänderungen und neuen Bindungspartnern

Das EF Hand Motiv ist die fünfthäufigste Peptidsequenz im Proteom (Carafoli et al., 2001). Die geringe Sequenzidentität (< 20%) und die große Anpassungsfähigkeit sowohl in der Konformation des Gesamtproteins wie auch die der einzelnen Bindungstaschen, erschwert die Klassifikation von neuen Familienmitgliedern als Calcium-abhängige Sensoren, Regulatoren oder Puffer (Ikura und Ames, 2005). Im Folgenden werden in Fallbeispielen die Methodenprotokolle vorgestellt, die eine Charakterisierung von neuen EF Hand Proteinen erlaubten und die Basis für die Analyse des Komplexes aus Neurexin und dem EF Hand Protein Neuroligin bildeten.

3.1.1 Konformationsraummodell

EF Hand Proteine zeichnen sich durch eine hohe Konformationsvielfalt aus, die einen direkten Vergleich zweier Proteinstrukturen erschweren. So werden NCS Proteine, aufgrund der Konformationsänderungen während des Myristoyl-Switches von Recoverin (Ames et al., 1997), in eine kleine und eine große Domäne eingeteilt, wohingegen CaM aus zwei gleich großen Domänen besteht (Yap et al., 1999; Gsponer et al., 2008). Zur Analyse, ob es für die Klassifikation von EF Hand Proteinen auch andere gemeinsame Kriterien gäbe als die Winkel der Helices im Calcium-bindenden Helix-Schleife-Helix Motiv (Yap et al., 2002), wurde



innerhalb der EF Hand Proteinfamilie nach Subdomänen gesucht, welche (i) gleiche Positionen der N- und C-Termini und mit Ausnahme von Schleifenregionen (*loops*) (ii) unveränderte interne C α -C α Abstände und Dihederwinkel aufweisen. Im Ergebnis wird die übliche Beschreibung der Struktur einer doppelten EF Hand als "Gewichts-Kugel" einer Hantel dem Protein nicht gerecht, da sich nur ein Teil dieser Einheit (Abb. 3-1A) wie ein Festkörper (*rigid body*) verhält (Abb. 3-1B). Interessanterweise zeigt sich hierbei, dass die Peptid- und Myristoylbindungsstelle in CaM und NCS Proteinen kongruent sind. Die Struktur von CaM und dessen Familienmitgliedern ist nicht in zwei, sondern in 5 Subdomänen untergliedert, die sich jeweils wie ein *rigid body* darstellen (Abb. 3-1E-F) und in einigen Proteinen unabhängig voneinander frei bewegen können. Zwei größere Subdomänen sind gleich und werden als Kernregionen *core1* und *core2* bezeichnet (Abb. 3-1D). Jede der 5 Subdomänen wird von calciumbindenden Schleifen getrennt, die sich wie Scharniere (*hinges*) verhalten. Zusätzlich gibt es den bekannten flexiblen helikalen Linker (Abb. 3-1E), welcher wie in CaM vollkommen gestreckt (pdb: 1cll), zweifach geknickt (1cdm) oder wie in Recoverin (1jsa) nahezu entfaltet sein kann (siehe unten). Diese Einteilung gilt nach obiger Analyse für alle 40 untersuchten EF Hand Proteine.

Die erhaltenen Subdomänen wurden unter Bildung aller Permutationen zu Gesamtproteinen zusammengesetzt. Der so erstellte Datensatz von bekannten und artifiziell hybridisierten Konformeren bildete das Konformationsraummodell. Eine neue Proteinsequenz konnte auf jede dieser Strukturen modelliert und die Sequenzunterschiede in den einzelnen Subdomänen direkt mit denen zu regulatorischen, sensorischen oder nur pufferenden EF Hand Proteinen verglichen werden. Für eine Konformationsanalyse wurden die Konformere auf einer der zentral gelegenen *core*-Strukturen superpositioniert und die Bewegungsänderungen der anderen Subdomänen durch eine Animation analysiert. Dieses Verfahren wurde erstmals bei der Strukturanalyse des Neuronalen Sensorproteins VILIP-1 angewandt.

3.1.2 Das Neuronale Sensorprotein VILIP-1 durchläuft beim Calcium-abhängigen Myristoylswitch einen Übergangszustand

Vilip-1 ist ein NCS Protein, von dem angenommen wurde, dass es einen Myristoyl-Switch wie Recoverin durchführen könnte (Braunewell et al., 1997). Anhand des Konformationsraummodells wurde untersucht, ob Vilip-1 die erforderlichen Konformationsänderungen durchführen könnte. Einige Ergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits publiziert (Braunewell et al., 2000). Zur Vilip Familie gehören Visinin, Vilip 1 bis 3, Hippocalcin, und die Neurocalcine. Für die Vilip Familie wurde ein auf die bereits bekannten Strukturen von Recoverin und Neurocalcin d basierendes strukturelles Alignment erstellt. Die VILIP Familie teilt sich 70-95%, die gesamte NCS Familie 30-60% identische Aminosäuren. Aufgrund dieser hohen Identitätswerte konnte unter Verwendung der Referenzstrukturen von calcium-freien und calcium-gebundenen Recoverin (PDB Einträge: 1jsa, 1iku), sowie calcium-gebundenem Neurocalcin d (1bjf) ein mechanistischer Ablauf des Myristoyl-Switch für VILIP-1 modelliert werden (Abb. 3-2). Die Analysen zeigen, dass NCS Proteine drei Subdomänen besitzen, welche ihre Positionen Calcium-abhängig wie Festkörper ändern können (*rigid-body motion*). Die *core1*-Subdomäne (Aminosäuren, As. 41-90, Abb. 3-

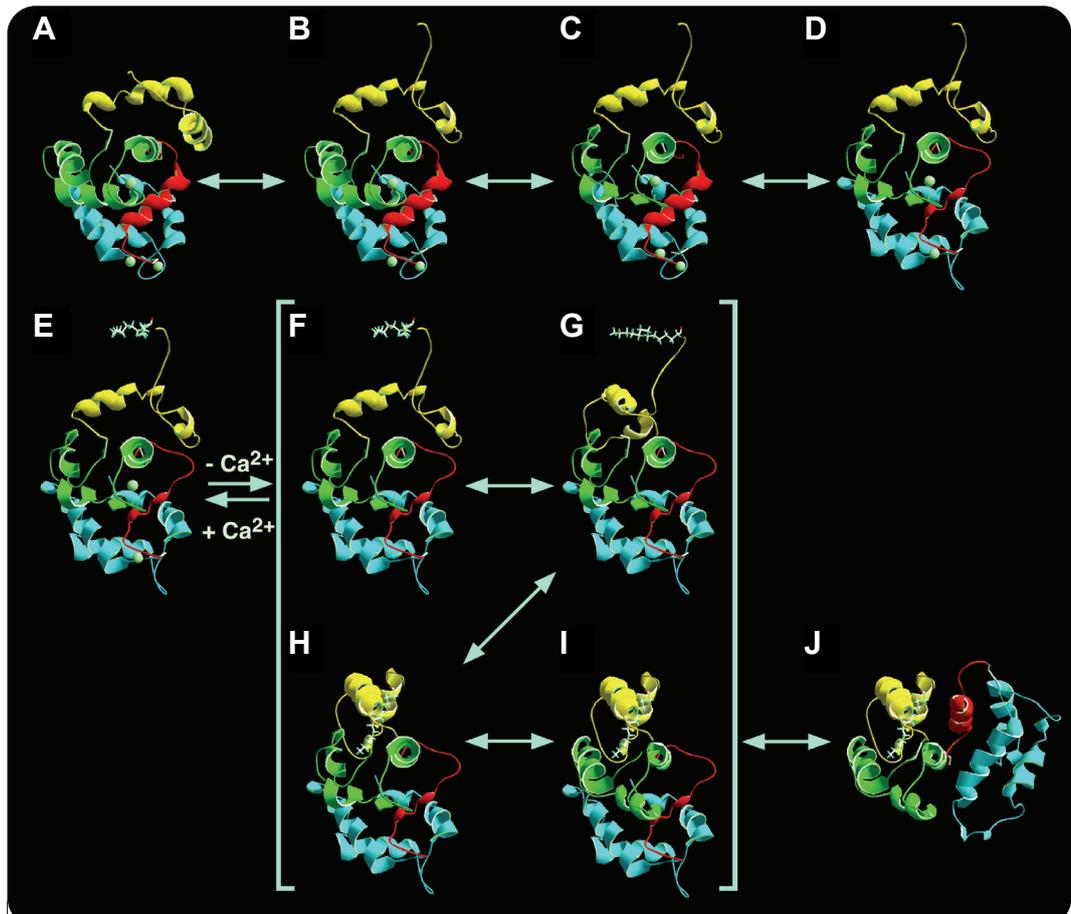


Abb 3-2. **Die calciumabhängige serielle Konformationsänderung von VILIP-1 durchläuft einen Übergangszustand.** Die Struktur von VILIP-1 unterteilt sich in 3 rigide Subdomänen: NSd. (gelb), *core1* (grün) und einer rigiden Einheit aus der *core2* und der CSd (*core2C*, beide cyan). Letztere ist durch eine flexible Helix (rot) mit *core1* verbunden. Mit Abnahme der Okkupanz von Calcium an den EF Händen, nimmt die Flexibilität dieser Helix zu (A-E). Die reversible Konformationsänderung von der calciumgebundenen (E) zur calciumfreien Form (J) kann seriell nur erfolgen, wenn die NSd zuerst den Platz für *core2C* frei gibt (F-I und vlg. D mit J). Infolgedessen gibt es einen Übergangszustand (H), nachdem die NSd sich bewegt hat und durch die Myristoylgruppe fixiert wird. Die nachfolgende Bewegung der *core2C* (I-J) wird durch einen Enthalpiegewinn bei der Ausbildung einer perfekten Helix (rot) unterstützt. Die Vilip-1 Konformere sind Modellstrukturen auf der Basis einer Rekombination der Kernstrukturen von Neurocalcin δ (A-C, PDB: 1bjf) und Recoverin (B-J, 1jsa und 1iku).

2, grün) der modellierten calcium-freien und calcium-gebundenen Vilip-1 Strukturen wurden überlagert und die Positionsänderungen der angrenzenden NSd (As. 1-40, Abb. 3-2, gelb) und der gekoppelten Einheit aus *core2* und CSd (As. 115-188, Abb. 3-2, cyan) als Bewegungen in Relation zur *core1*-Subdomäne interpretiert. Die *core1* und die *core2*/Sd Einheit sind durch einen relativ starren, aber dennoch teilweise entfalteten helikalen Linker verknüpft (As. 91-114, Abb. 3-2, rot). In der Calcium-gebundenen Struktur ist die Myristoyl-gruppe frei zugänglich und könnte in einer Membran verankert werden. Mit abnehmender Besetzung (Okkupanz) von Calcium nimmt die Flexibilität in der Hauptkette zu (Abb. 3-2A-D). Diese Änderungen wurden als interne Konformationsänderungen interpretiert, die die Sensitivität der NCS Struktur erhöhen. Der Konformationsübergang von der Calcium-gebundenen (Abb. 3-2E) zur Calcium-freien Struktur (Abb. 3-2J) kann mechanistisch in nur einer definierten Reihenfolge geschehen, da sterische Barrieren überwunden werden müssen. So kann die

Myristoylgruppe erst binden, wenn sich die N-terminale Subdomäne im Vorfeld in einer Gleitbewegung (*shere motion*) über Helix E (*core1*, grün) vorbei geschoben hat (Abb. 3-2F-I). Diese Bewegung ist sterisch nicht möglich, wenn die Myristoylgruppe zuvor an die N-terminal Domäne gebunden hat. Sie ist auch nicht möglich, wenn die EF Hände 2 und 3 Calcium-gesättigt sind, da nur die Calcium-freien Referenzstrukturen eine für die Gleitbewegung benötigte teilweise entfaltete Helix E zeigen. Erst durch die Reorientierung der NSd zur *core1*-Subdomäne wird die tiefe hydrophobe Myristoyl-Bindungstasche erzeugt, die anteilig von beiden Subdomänen ausgebildet wird. Die Bindung der Myristoylgruppe arretiert die Konformation. Nach der Gleitbewegung wird der vorher vom N-Terminus belegte Platz frei und kann von der gekoppelten *core2/CSd* Einheit besetzt werden. Die letzte Konformationsänderung ist nur möglich, wenn die EF Hand Schleife 3 Calcium-frei ist. Die Calciumbindungen an EF Hände 1 und 4 spielen bei diesem Mechanismus keine Rolle. In den meisten NCS Proteinen ist EF Hand 1 mutiert und kann kein Calcium binden (Burgoyne, 2007). Die Calciumbindung an EF Hand 4 bewirkt nur geringe lokale Änderungen und deren Faltung ist zu der von CaM identisch.

Dieser sequenzielle Ablauf des Myristoyl-Switch ist nach diesem Modell reversibel. Bei niedriger Calciumkonzentration stehen die Konformationszustände 6 bis 10 im Gleichgewicht. In Membrannähe erlaubt der Zustand 6 die Verankerung mit der Membran, während die lipophile Myristoylgruppe durch den Endzustand 10 versteckt wird. Werden die EF Hände 2 und 3 mit Calcium gesättigt, so arretieren sie den Zustand 6. Die Existenz des Übergangszustands 9 wurde zwei Jahre später durch die NMR Struktur einer Recoverinmutante bestätigt (Ames et al., 2002). Eine Punktmutation an der EF Hand 2 hat zu einer Myristoyl- und Calcium-gebundenen intermediären Struktur wie in Abb. 3-2I geführt. Für die Gleitbewegung der NSd und die Ausbildung der vollständigen Myristoylbindungsstelle ist die freie Beweglichkeit von EF Hand 2 erforderlich, während EF Hand 3 die Bewegung der *core2/CSd* Einheit reguliert. Da die mutante Recoverinstruktur unter Calciumbedingungen gelöst wurde, war die EF Hand 3 Calcium-gebunden und die gezeigte Konformationsänderung (Abb. 3-2I-J) blockiert.

Das Konformationsraummodell erlaubt eine neue Betrachtungsweise für das scheinbar paradoxe Verhalten von Vilip und GCAPs. Hiernach durchlaufen Vilip, Recoverin und Neurocalcine alle Zustände (Abb. 3-2I-J), während GCAP nur in den Zuständen entsprechend A bis G (Abb. 3-2) vorkommt. Kristallstrukturen von GCAP hatten Zustände wie in E (pdb: 2ggz) und F (pdb: 2r2i), wobei die Gleitbewegung der NSd (F nach G) im Ansatz erkennbar war und beide Strukturen noch Calcium an den EF Händen 3 und 4 gebunden hatten. Dass die Myristoylgruppe von GCAPs auch in calciumfreier Lösung noch frei zugänglich ist und auch das Lockern der "Scharniere" durch Mutationen an den EF Händen keine Änderung brachte (Hwang und Koch, 2002), spricht für eine sterische Blockade der Bewegung der NSd, die den Raum für die *core2/CSd* Einheit nicht frei machen kann.

Für die Betrachtung aller EF Hand Proteine müssen den gezeigten Intermediärstrukturen noch weitere hinzugefügt werden, wie z.B. die mit gestrecktem und geknicktem flexiblen Linker (Abb. 3-1E) und eine bei der die Myristoylgruppe an die NSd angedockt hat. Die Untersuchungen lassen vermuten, dass Selektion und Wirkungsweise von EF Hand Proteinen

auf Zielproteine mehr eine Folge eines spezifisch besetzten Konformationsraums darstellen und eine alleinige Betrachtung von Sequenzunterschieden in den EF Händen für Erklärungsversuche nicht ausreichen. Hierfür spricht auch, dass sich NCS Proteine anhand der Öffnungswinkel ihrer EF Hand Scharniere klassifizieren lassen (Yap et al., 2002).

Die folgenden EF Hand Proteine können in drei Konformationsraumgruppen eingeteilt werden: (i) CaM und Caldendrin, (ii) GCAPs und (iii) Recoverine, Vilips, Neurocalcine. Diese Einteilung korreliert mit den von diesen Proteinen gebildeten drei Klustern auf einer Protein-Protein-Interaktionskarte (Haynes et al., 2006). Nur Proteine innerhalb einer Gruppe besaßen viele gemeinsame Bindungspartner. Interessanterweise, enthielt der jeweilige Cluster sowohl calciumabhängige wie calciumunabhängige Interaktionen, so dass die Calciumabhängigkeit kein Kriterium für die Differenzierung der Cluster darstellte. Nach den hier angestellten Vergleichen, ist zu vermuten, dass Proteine mit gleichen Konformationsräumen auch gemeinsame Interaktionspartner besitzen.

3.1.3 Bestimmung von Bindungsstellen für EF Hand Proteine

Die *core*-Subdomäne (Abb. 3-1) half bei der Findung von Bindungsstellen für Caldendrin auf neuen Interaktionspartnern, da sie in CaM und Caldendrin nur wenige Sequenzunterschiede aufweist (Daten nicht gezeigt) und dementsprechend ein ähnliches Bindungsmotiv wie CaM besitzen sollte. CaM und Caldendrin teilen sich die meisten Interaktionspartner (Haynes et al., 2006), aber Caldendrin besitzt mit Jacob und Map1/LC3 exklusive Bindungspartner. Keines der für CaM bekannten Bindungsmotive (siehe *CaM target database*) konnte in der Jacob oder LC3 Sequenz identifiziert werden. Bei näher Betrachtung stellte sich heraus, dass in allen untersuchten CaM/Peptid Strukturkomplexen in der PDB eine lange isoliert stehende hydrophobe Seitenkette des Peptids dieses an die *core*-Subdomäne verankert. Durch Modellierung der Jacobsequenz als durchgängige Helix wurde nach isoliert stehenden hydrophoben Resten (F, I, L, W) gesucht und zwei Kandidaten, F241 und I260, identifiziert. Letztendlich führte nur die Mutation F241E zum kompletten Bindungsverlust. Es wurden noch weitere Mutationen wie die Entfernung einer Reihe basischer Reste durchgeführt, die aber nicht den gleichen Effekt hatten, so dass F241 als essentieller hydrophober Ankerrest identifiziert wurde. Diese Arbeit wurde kürzlich publiziert (Dieterich et al., 2008). Mit der gleichen Methode konnte die Caldendrinbindungsstelle auf LC3 identifiziert und der Komplex modelliert werden (Seidenbecher et al., 2004). Entsprechend konnte durch Modellierung gezeigt werden, dass Caldendrin womöglich auch an lange hydrophobe Reste der *hook*-Region der Membranassoziierten Guanylatkinasen (MaGuKs) SAP90, SAP102 und SAP97/PSD-95 bindet (Strumpf et al., 2003). Ungeachtet der Bedeutung dieser Protein-Protein Interaktionen, zeigen diese Ergebnisse, dass die Sequenzmotive für EF Hand Protein Bindungen zu restriktiv sind als dass ihr Nichtvorhandensein eine CaM-ähnliche Bindung ausschliesse. Während in Jacob die Bindungsregion noch eine entfernte Ähnlichkeit mit einem IQ-Motiv (Houdusse und Cohen, 1995) ausweist (Dieterich et al., 2008), so gibt es in LC3 oder den MaGuKs keine Korrelation zu einem bekannten Motiv (Seidenbecher et al., 2004) und Daten nicht gezeigt). Die Bindungstasche in der *core*-Subdomäne wird durch lange Seitenketten gebildet, die eine hohe Anpassungsfähigkeit an sehr unterschiedliche Sequenzen

erlauben. Zusätzlich wird durch Calciumbindung an die EF Hände die Öffnungsgröße und Tiefe der vollständigen Bindungstasche verändert, die aus NSd und *core1*, bzw. CSd und *core2* gebildet wird. Eine lange von einer Helix exponierten hydrophoben Seitenkette ist das einzige markante Merkmal einer EF Hand Proteinbindungsstelle und auf dessen Basis die Modellierung eines Komplex versucht werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Beispiele der EF Hand Proteine Caldendrin und Vilip, dass die Definition von *core*-Strukturen und Konformationsanalysen eine effektive Planung und Interpretation von Mutagenesestudien an Proteinen erlauben. Die hier entwickelte Strategie sollte im 2. Teil der Arbeit anhand eines komplett neuen Problems getestet werden. Das EF Hand Protein Neuroligin sollte diesen Analysen zu Folge ebenfalls eine *core*-Subdomäne besitzen und in Analogie an eine von einer Helix exponierten hydrophoben Seitenkette von Neurexin binden.

3.2 Identifikation und Charakterisierung von Calciumbindungsstellen im transsynaptischen Neurexin/Neurologin Komplex

Neurexin und Neurologin bilden schon bei einer mikromolaren Calciumkonzentration über ihre LNS (Neurexin) und CAM Domänen (Neurologin) einen transsynaptischen Komplex aus (Ichtchenko et al., 1995; Nguyen und Südhof, 1997), wobei angenommen wurde, dass Calcium an eine oder zwei EF Hände von Neurologin (Tsigelny et al., 2000), nicht aber Neurexin bindet (Nguyen und Südhof, 1997). Entsprechend wurde die LNS Domänenstruktur von β -Neurexin Calcium-frei bestimmt (Rudenko et al., 1999).

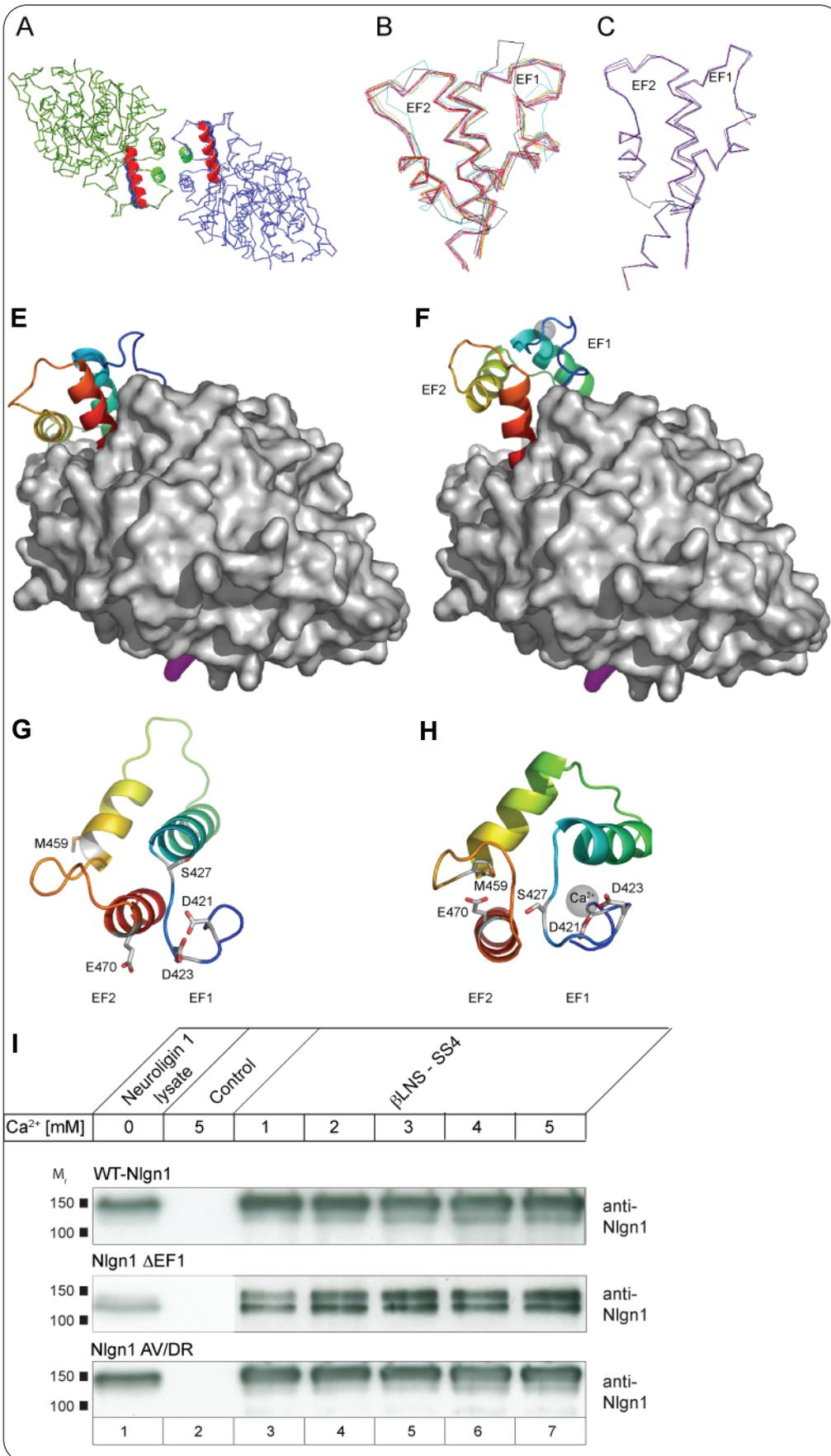
Die Kontaktflächen im Komplex beider Proteine waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit ebenso wenig bekannt wie die Art der Interaktion mit Calcium. Zur Bestimmung der Calciumbindung und der beidseitigen Kontaktstellen wurden Modelle von Neurologin anhand der analogen Strukturen von Cholinesterasen (Harel et al., 1995; Schallreuter et al., 2007) erstellt und zusammen mit der LNS von β -Neurexin (Rudenko et al., 1999) mögliche Szenarien für die Komplexbildung erprobt. Nachfolgend wurden die putativen Kontaktflächen mittels gezielter Mutagenesen untersucht. Hierbei galt das Ziel, Mutationen zu kreieren, die einen kompletten Bindungsverlust verursachen und dennoch eine Aussage über die chemische Natur der Kontaktstelle erlauben. Dies wurde erreicht, in dem Epitope von anderen Mitgliedern der jeweiligen Domänfamilie auf die LNS oder die CAM übertragen wurden. Die kürzlich gelösten Kristallstrukturen von Neurexin/Neurologin Komplexen erlaubten schliesslich eine noch detaillierter Reanalyse aller bisher durchgeführten Bindungsstudien. Auf Basis von hochaufgelösten Strukturdaten (Chen et al., 2008) konnte ein Alanin-Scan durchgeführt werden und essentielle Reste (*hot spots*) an der Kontaktstelle des Neurexin/Neurologin Komplex bestimmt werden.

3.2.1 Die EF Hände von Neurologin sind degeneriert und für die Prozessierung aber nicht für die Neurexinbindung erforderlich

Vorherige biochemische Studien haben die Calciumabhängigkeit der Komplexbildung auf die Calciumkoordination durch die Neurexinbindungspartner wie Neurologin (Nguyen und Südhof, 1997) oder α -Dystroglycan (Sugita et al., 2001) zurückgeführt, weil für Neurexine keine Calciumbindung nachgewiesen werden konnte (Nguyen und Südhof, 1997). Obgleich die Aminosäuresequenz von Neurologin kein bekanntes Motiv für eine Calciumbindungsstelle aufwies, konnten mittels eines "Hidden Markov Modell"-Verfahrens (HMM) zwei putativ calciumbindende Sequenzabschnitte identifiziert werden (EF1 und EF2, Abb. 3-3), die denen einer doppelten EF Hand sehr ähnlich waren (Tsigelny et al., 2000). Zur Prüfung der Hypothese, dass diese Regionen auch die Struktur von Calcium-bindenden EF Händen ausbilden können und für die Neurexinbindung erforderlich sind, wurde diese Region in Strukturmodellen analysiert und nachfolgend für eine Präzipitation (*pull-down*) mit Neurexin deletiert. Die

		x	y	z	-y	-x	-z								
CaM-EF1	20-	D	-	K	D	G	D	G	T	I	T	T	K	E	-31
CaM-EF2	56-	D	-	A	D	G	N	G	T	I	D	F	P	E	-67
N11-EF1	421-	D	-	S	D	D	G	V	S	A	S	D	F	D	-432
N11-EF2	459-	M	-	Y	T	D	W	A	D	R	H	N	P	E	-470
N11-EF1(HMM)	421-	D	S	D	D	G	V	S	A	S	D	F	D	-432	

Abb. 3-3 Sequenzvergleich der EF Hände von CaM und Neurologin 1 nach Modellierung (N11EF1 und N11EF2, wie in Abb. 3-4F & H) und nach dem HMM Verfahren (N11EF1-HMM, Tsigelny et al., 2000).



kürzlich gelösten Neuroliginstrukturen erlauben eine detailliertere Analyse der EF Hand Regionen (Abb. 3-4) als sie zu Beginn der Arbeit mit den Modellstrukturen auf Basis von Cholinesterase-ähnlichen Strukturen (CAMs) möglich war (Daten nicht gezeigt). Die EF2 (As. 459-470 in Neuroligin 1) ist wie alle Neuroligin Strukturen zeigen, Teil der Dimerkontaktstelle von Neuroligin (Abb. 3-4A). Sie ist in allen CAMs konsistent gefaltet, während die Schleifenverläufe der EF1 in Neuroligin (As. 421-432) und der Butyrylcholinesterase (BuChE) stark abweichen (Abb. 3-4B). Die beiden EF Hände sind hingegen trotz unterschiedlichster Bedingungen (mit und ohne Zusatz von Calcium und Neurexin) innerhalb der Neuroligin-1, -2 und -4 Strukturen (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Chen et al., 2008; Koehnke et al., 2008) unverändert (Abb. 3-4C). Diese rigide Faltung der doppelten EF Hand Region innerhalb der Neuroliginfamilie entspricht keiner bekannten Struktur von EF Hand Proteinen und erlaubt keine direkte Calciumkoordination. Hierzu wurde ein Strukturmodell der Neuroligin EF Hände auf Basis der Koordinaten der ebenfalls 12 Reste langen EF Hände von Calmodulin (PDB: 1c1l) erstellt. Die Modellierung zeigte zudem, dass sich die vom HMM Verfahren (Tsigelny et al., 2000) erhaltene Sequenzzuordnung (Abb. 3-3D, unterste Reihe) in einem Strukturmodell nicht realisieren lässt, da sich eine 12-Reste lange bereits maximal gedehnte Schleife nicht weiter auf die Länge von 14 Resten strecken lässt. Demnach waren die Aminosäurezuordnung nach dem HMM Verfahren nicht korrekt. Ein Vergleich der Neuroliginstrukturen mit dem CaM-basierten Neuroliginmodell zeigte, dass deren EF Hände eine Konformationsänderung durchführen müssten, um Calcium zu koordinieren (Abb. 3-4E und F). Dabei würde allerdings die Dimerkontaktstelle durch eine Bewegung von EF2 aufgelöst. Da die Dimerisierung für die Passage aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) erforderlich ist (siehe unten und (De Jaco et al., 2006)) dürfte diese Konformationsänderung nur in nachfolgenden Kompartimenten oder im synaptischen Spalt durchgeführt werden. Eine Calciumbindung an EF1 führt nach diesen Analysen zu einer monomeren Neuroliginstruktur, die allerdings bisher noch nicht nachgewiesen wurde (Comoletti et al., 2006).

Abb.3-4 (linke Seite). **Die putativen EF Hände von Neuroligin sind degeneriert und für die Neurexinbindung nicht erforderlich.** (A) Von den vier Interdomainhelices des Neuroligindimers (PDB: 3bix) werden zwei von der EF Hand 2 (grün) gebildet. (B) Superposition der doppelten EF Hand Regionen (EF1 und EF2) repräsentativer CAM Strukturen. Neuroligin (schwarz) und BuChE (cyan) zeigen als einzige Strukturen eine andere Schleifenkonformation an der EF1, während die Anordnung der Helices identisch ist. (C) Superposition der doppelten EF Hände der Strukturen von Nlgn 1 (3b3q, blau, 3biw, grün, 3bix schwarz), Nlgn 2 (3be8, rot) und Nlgn 4 (2yh8, gelb). Trotz unterschiedlicher Bedingungen bleibt der Hauptkettenverlauf der EF Hand Schleifen konstant. (E-F) Eine Calciumbindung würde die Helix der EF 2 (E, grün) aus dem Verbund der Neuroligin Dimerkontaktstelle entfernen (F). Darstellung des rechten Neuroliginmonomers aus A. Modellbau der doppelten EF Hand Region in E auf Basis von Calmodulin (1c1l). Zur Orientierung wurde die *splice*-Insertionsstelle B in magenta kartiert. (G-H) Im Modell kann Calcium nur von EF1 koordiniert werden. In der Neuroliginstruktur (G, PDB: 3bix) sind D421 und D423 bereits in einer calciumbindenden Konformation, während die Carbonylgruppe von S427 erst durch Entfaltung einer Windung der nachfolgenden Helix (cyan) Calcium bindet (H). Die EF1 könnte nach der Konformationsänderung (E-F) Calcium mit drei Sauerstoffliganden koordinieren, enthält aber D421 an Stelle eines für EF Hände typischen *bidentate* Glutamats. Die EF2 besitzt mit dem konservierten E470 zwar einen solchen Liganden, aber die Calciumbindung wird durch M459 sterisch blockiert. (I) Die EF1 Region ist für die calciumabhängige Bindung von Neurexin an Neuroligin nicht erforderlich. *Pulldown* von Neuroliginmutationen aus COS-7 Lysaten mittels IgG-Neurexin 1 β und IgG als Kontrolle. Die Deletion der EF1 (As. DSDDG VSASD FDF) verändert nicht die Calciumabhängigkeit der Neurexin/Neuroligin Komplexbildung (mittlere Reihe). Die Bindung von Neurexin an glykosyliertes und nicht-glykosyliertes Neuroligin ist bei dieser Mutation deutlich in Form einer Neuroligin-Doppelbande erkennbar.

In den Neuroliginkristallstrukturen (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Chen et al., 2008; Koehnke et al., 2008) sind nur zwei saure Reste (D421 und D423 in Neuroigin 1) in einem für eine Calciumkoordination geeigneten Abstand (Abb. 3-4F). Nach einer bestmöglichen Modellierung auf Basis der CaM Koordination, ergeben sich maximal drei calciumbindende Reste an der EF1 und nur einer an der EF2 (Abb. 3-4G), während Calmodulin-ähnliche EF Hand Proteine in der Regel vier Reste zur Calciumkoordination benutzen (Grabarek, 2006). Interessanterweise konnte in allen kürzlich gelösten Neuroiginstrukturen kein Calcium an den putativen EF Händen nachgewiesen werden (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Chen et al., 2008; Koehnke et al., 2008), was dafür spricht, dass (i) keine Konformationsänderung (Abb. 3-4E-F) durchgeführt wird und (ii) die geringe Anzahl an gut positionierten sauren Resten nicht für eine Calciumkoordination ausreicht.

Nach diesen Analysen wäre eine Calciumbindung nur an EF1 möglich. Zur Überprüfung der Idee, dass EF1 für die calciumabhängige Neurexin/Neuroigin Komplexbildung verantwortlich sei (Nguyen und Südhof, 1997; Tsigelny et al., 2000), wurde EF1 in Neuroigin 1 deletiert und das erhaltene Nlgn1 Δ EF Konstrukt in Bindungsstudien mit β -Neurexin getestet. Die optimalen Schnittbereiche für eine Deletion der EF1 Schleife wurde anhand einer Neuroiginmodellstruktur bestimmt (As. 421-433). Die Deletion von EF1 führte größtenteils zu einer Retention von Neuroigin im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und verhinderte hierüber auch die Sekretion von IgG-fusioniertem Neuroigin in das Medium von COS-7 Zellen. Die gleichen Defekte im Proteintransport wurden nach Alanin-Mutationen an der Dimerkontaktstelle von Neuroigin beobachtet (Dean et al., 2003). Die EF1 bildet einen direkten Kontakt zur Dimerbindungsstelle, so dass dessen Deletion vermutlich nicht mehr die für eine Dimerisierung erforderliche Stabilität gewährleistet. Das die erhaltenen Nlgn1 Δ EF1 Proteine dennoch funktionell bleiben, zeigen die *pull-down*-Experimente von rekombinanten Neuroiginen aus COS-7 Lysaten mit IgG- β LNS. Die Calcium-abhängige Bindung von β LNS zu Nlgn1 Δ EF1 ist gegenüber der zu Wildtyp Neuroigin 1 nicht verändert (Abb. 3-4H, mittlere Reihe). Die putativen EF Hände von Neuroigin sind nach diesen Untersuchungen degeneriert und weder für die Neurexinbindung erforderlich, noch tragen sie zur Calciumabhängigkeit der Komplexbildung bei. Dieses Ergebnis richtete das Augenmerk auf die LNS Domänen von Neurexinen als mögliche Calcium-bindende Domänen.

3.2.2 LNS Domänen besitzen eine einheitliche Kernstruktur mit spezifischen elektrostatischen Oberflächenpotentialen und Calciumbindungsstellen

LNS Domänen wurden ursprünglich als eine Konsensusregion innerhalb der Sequenzen von Laminin, Neurexin und dem Sexhormon-Bindungsprotein SHBG definiert (Missler und Südhof, 1998). Die Sequenzidentität in dieser Domänfamilie liegt allerdings unter 20% und nur strukturbasierte Verfahren wie sie von SCOP (Murzin et al., 1995), DALI (Holm und Sander, 1995) und AnDOM (Schmidt et al., 2002) genutzt werden plazieren Laminine, Neurexine, SHBG, Agrine und Gas6 in eine gemeinsame Faltungsfamilie. Von allen LNS Familienmitgliedern wurden bereits Strukturen gelöst, die bis auf die β -Neurexin LNS Calcium gebunden hatten. Um herauszufinden, was die LNS Domänen insbesondere von

Neurexin charakterisiert, wurden die LNS Strukturen von Agrin, Laminin, Neurexin, Gas6, SHBG und Pentraxin im Detail verglichen (Emsley et al., 1994; Hohenester et al., 1999; Rudenko et al., 1999; Grishkovskaya et al., 2000; Stetefeld et al., 2004; Sasaki et al., 2006; Sheckler et al., 2006). Die Anwendung von paarweisen strukturellen Vergleichen deckte eine Kernstruktur innerhalb der LNS Domäne auf (Abb. 3-5A). Deren Hauptkette weist bei allen Familienmitgliedern nahezu identische C α -Positionen auf (r.m.s.d. < 1.5Å) und stellt auch den strukturellen Konsens zu entfernt verwandten Lektinen wie zur Sialidase (PDB: 1sll), Galectin (4gal) oder Chondroitinase (2q1f) her, die ebenfalls diese Kernstruktur besitzen (Daten nicht gezeigt). Die Kernstruktur ist aus den β -Strängen β 2 bis β 11 aufgebaut und wird durch hydrophobe Reste stabilisiert, die ein Fragment der β 10/ β 11 Schleife (As. 234-238 in Neurexin 1 β LNS) fest mit dem Rest der Kernstruktur verknüpfen. Die Sequenzidentität der Kernstruktur ist 5% größer im Vergleich zur gesamten LNS Domäne (13% Identität, 60% Ähnlichkeit bei Benutzung von BLOSUM62). Diese rigide Kernstruktur ist verantwortlich dafür, daß alle an der Calciumkoordination beteiligten Aminosäuren in Agrin, Laminin und Neurexin unabhängig von der Anwesenheit von Calcium und wie kürzlich gezeigt (Shen et al., 2008) auch von *splice*-Insertionen wie SS4 in Neurexin (PDB: 2r1b) identisch positioniert sind. Der R.M.S.D (*root mean square deviation*, Wurzel des mittleren quadratischen C α -C α Abstands) bei diesen drei Proteinen beträgt 0,63 Å und liegt unterhalb der doppelten Standardabweichung des strukturellen Koordinatenfehlers (nach Luzzati) der Neurexin 1 β Struktur (PDB Eintrag: 1C4R). Zur Bestimmung der exakten Grenzen der Kernstruktur und der Gesamtdomäne wurden die Änderungen von domäninternen C α -C α Abständen und Ramachandranwerten für alle LNS Domänen paarweise berechnet (Abb. 3-5B). Größere Differenzen in den LNS Domänen ergeben sich in den nicht-konservierten Schleifenregionen und den bis zu 20 Grad gedrehten C-terminalen β -Strang β 13 (As. 285-290 in Neurexin 1 β), während es keine Positionsänderungen bei den Calciumkoordinierenden Aminosäuren gibt (Sternchen in Abb. 3-5B). Die Rigidität der von drei Schleifen gebildeten Calciumbindungsstelle ist einzigartig, da die Calciumbindung in den anderen Proteinen an flexible Schleifen erfolgt, die zudem wie bei EF-Hand Proteinen, Cadherinen oder EGF-ähnlichen Proteinen Konformationsänderungen durchführen (Koch et al., 1999; Ogiso et al., 2002; Grabarek, 2006).

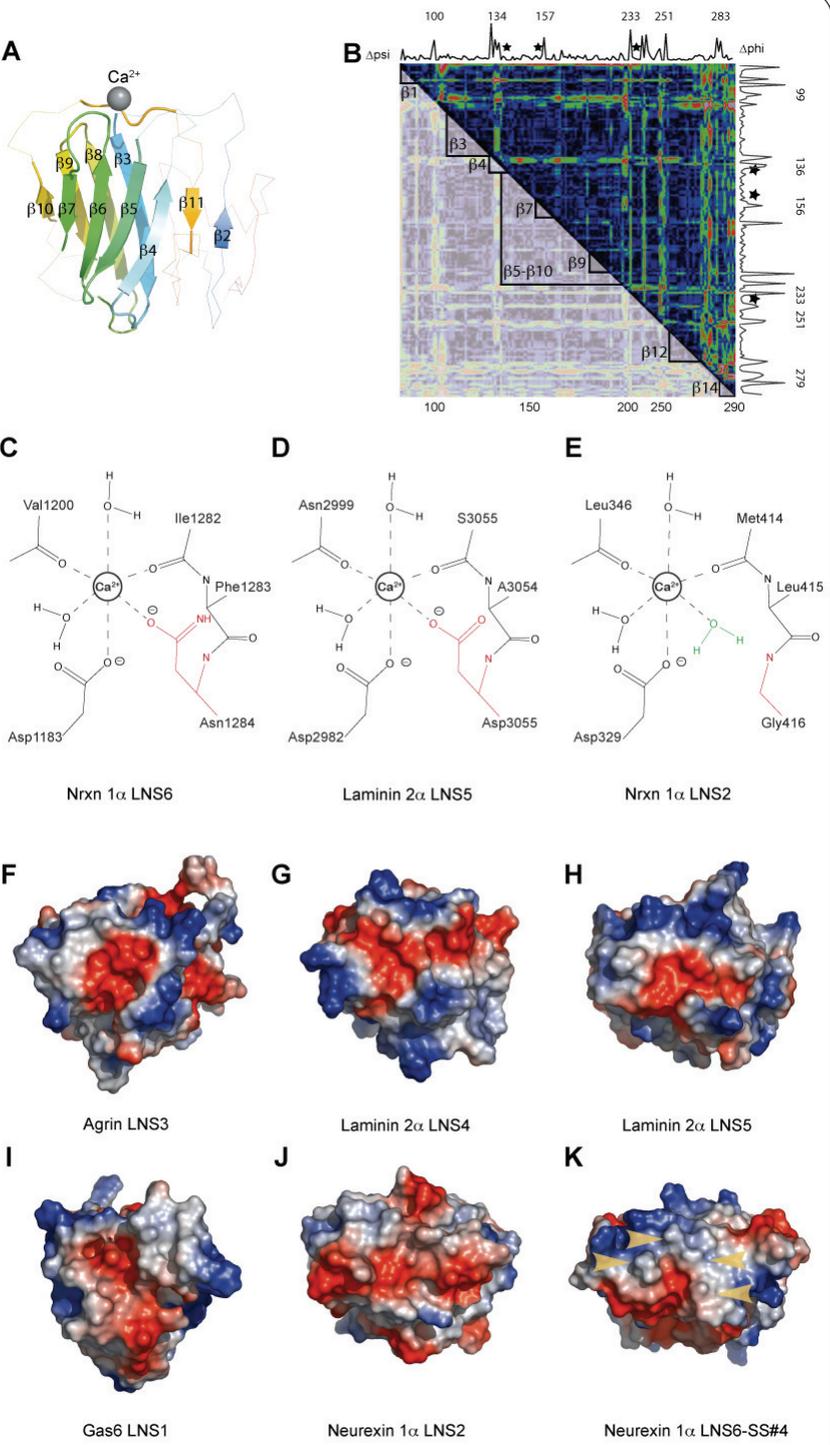
Die hoch konservierten Koordinaten der Calciumbindungsstelle innerhalb der Kernstruktur erlaubten die Ableitung der Calciumkoordination für Neurexin 1 α LNS6 (Abb. 3-5C) und Neurexin 1 β LNS (Abb. 3-5A) durch Homologie-Modellierung unter Verwendung der Laminin 2 α LNS5 Struktur als Vorlage (Abb. 3-5D). In diesen beiden Proteinfamilien wie auch den meisten anderen LNS Domänen (Daten nicht gezeigt) sind an der oktaedrischen Calciumkoordination zwei azide Seitenketten (Asn oder Asp), zwei Hauptketten-Carbonylsauerstoffe und zwei Wassermoleküle beteiligt. Die später gelöste Kristallstruktur der Neurexin 1 α LNS2 zeigte die gleiche Kernstruktur und erstmals eine Calciumbindung an Neurexin (Sheckler et al., 2006). Die Calciumbindung an die LNS2 war unerwartet, wie die einzigartige Koordination zeigt (Abb. 3-5E): während die Calcium-bindenden Aminosäuren α D329, α L346 und α M414 konserviert sind, ist die dem Laminin 2 α D3055 entsprechende Aminosäure durch ein Glycin ersetzt. An der analogen Stelle zur Carboxylatgruppe von

Abb 3-5. LNS Domänen haben eine gemeinsame Kernstruktur.

(A) Kernregion der LNS Domänen von Agrin, Laminin, Gas6, Neurexin, Pentraxin und SHBG, deren Ca-Positionen bei einem paarweisen Strukturvergleich weniger als 0.9Å (R.M.S.D) abweichen. Die dünne Linie repräsentiert die Hauptkette von Neurexin 1bLNS. Die Kernstruktur, (β -Stränge $\beta 2$ bis $\beta 11$) macht 53% der Gesamtdomäne aus und enthält in Agrin, Laminin und Neurexinen eine Calciumbindungsstelle, die von den drei Schleifen $\beta 5/\beta 6$, $\beta 6/\beta 7$ und $\beta 10/\beta 11$ ausgeformt wird.

(B) Differenzabstandsdiagramm interner C α -C α Abstände und Differenzramachandrunkurven ($\Delta\psi$, $\Delta\phi$) der LNS Domänenstrukturen von Agrin (PDB: 1pz9) und Neurexin (1c4r). Die Differenzabstandsmatrix zeigt die Abstandsbeträge von 0Å (dunkelblau) bis 8Å (rot). Jede Änderung der internen Abstände geht mit einer Änderung der Dihederwinkel einher. Die Positionen der an der Calciumbindung beteiligten Aminosäuren (*) ändern sich hingegen nicht. Die Sequenznummerierung (oben, an der Seite und unten) ist von Neurexin 1 β .

(C-E) Die Calciumkoordinierung in Laminin, Neurexin und Agrin ist konserviert. In der Modellstruktur von Neurexin 1 α LNS6 (C) und den Kristallstrukturen von Laminin 2 α (D), Agrin (Daten nicht gezeigt) und Neurexin 1 α LNS2 (E) ist ein Calciumion durch sechs Sauerstoffionen (Nettoladung -2) unter Ausbildung eines oktaedrischen Komplexes koordiniert. Zwei Hauptketten Carbonylsauerstoffe und die Carboxylatgruppe eines konservierten Aspartats sind identisch plziert. (E) In Neurexin 1 α LNS2 ist das zweite Aspartat (Laminin, rot in D) oder Asparagin (Neurexin 1 α LNS6, rot in C) durch Glycin 416 (rot) und ein Wassermolekül (grün) ersetzt. (F-K) Elektrostatische Oberflächenanalyse an der Region um die Calciumbindungsstelle. Die elektrostatischen Eigenschaften in Agrin LNS3 (F), Laminin 2 α LNS3 (Daten nicht gezeigt), 2 α LNS4 (G) und 2 α LNS5 (H) sind sehr ähnlich, ein negativer Pol (die zentrale Calciumbindungsstelle, rot) wird von einem nahezu geschlossenen Ring aus positiv geladenen Aminosäureresten umgeben. Das elektrostatische Oberflächenpotential von Gas6 LNS1 (I) ist ähnlich dem von Laminin, die an der negativen "Buchse" beteiligten Reste sind hingegen nicht konserviert und binden kein Calcium (Sasaki et al., 2006). Die Oberfläche der Neurexin 1 α LNS2 Domäne (J) ist weitestgehend negativ geladen und die Calciumbindungsstelle ist nicht gut konturiert. Bei Neurexin 1 α LNS6 (K) ist die Calciumbindungsstelle nicht größer als der van der Waals-Radius von Ca²⁺ und wird zusätzlich durch lange hydrophobe Reste umschlossen, die sich von der ansonsten flachen Oberfläche abheben (Pfeile in K).

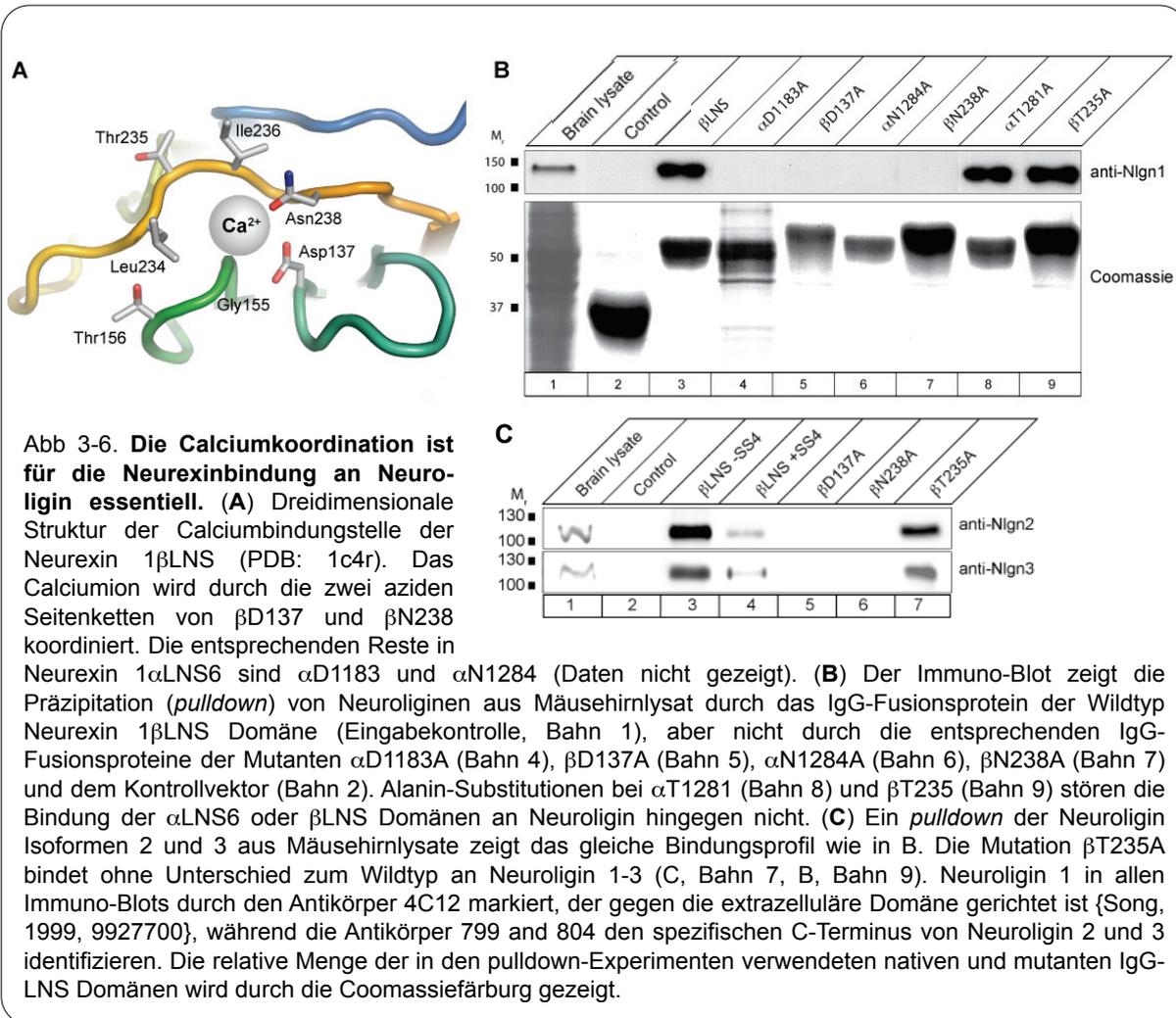


Laminin 2 α wurde ein Wassermolekül identifiziert, welches die Carboxylatgruppe sozusagen mimickiert und dadurch für die isolierte Neurexin 1 α LNS2 Domäne ausreichende Calciumaffinität bewahrt (Sheckler et al., 2006).

Im Gegensatz zur rigiden Kernstruktur, sind die β -Schleifen in der Nähe zur Calciumbindungsstelle die Orte an denen bei Agrin und Neurexin über *Alternatives Splicing* zusätzliche Aminosäuresequenzen inseriert werden, wodurch sie den Namen "Hypervariable Regionen" erhalten haben (Rudenko et al., 2001). Die Länge der β -Schleifen variiert beim Vergleich der LNS Domänen, so daß ich die Hypothese aufgestellt habe, daß die Oberfläche in der Umgebung zur Calciumbindungsstelle für die spezifischen Eigenschaften der jeweiligen LNS verantwortlich sei. Zur Konkretisierung wurden aus den Strukturen errechnete elektrostatische Potentialkarten auf die Van der Waals-Oberfläche der LNS Domänen abgebildet (Abb. 3-5F-K). In den meisten untersuchten LNS Domänen ist die Calciumbindungsstelle durch einen negativen Pol gekennzeichnet, der durch einen fast geschlossenen Ring aus positiven Seitenketten umgrenzt wird (Abb. 3-5F-I). Die Neurexin 1 α LNS Domänen 2 und 6 unterscheiden sich von dieser "Standardoberfläche", da die Oberfläche in LNS2 fast gänzlich negativ ist (Abb. 3-5J) und noch ungewöhnlicher, hydrophobe Reste die Calciumbindungsstelle der LNS6 umschliessen (Abb. 3-5K). Diese Daten zeigen, dass alle LNS Domänen eine gemeinsame Kernstruktur besitzen, wobei eine Untergruppe aus Agrin, Neurexin und Laminin eine rigide Calciumbindungsstelle enthält. Die Calciumbindungsstellen von anderen LNS Domänen (u.a. SHBG, Gas6, Pentraxin) sind auf unterschiedlichen Epitopen auf der Proteinoberfläche lokalisiert, werden von flexiblen Schleifen gebildet und haben eine nicht vergleichbare Calciumkoordination (Emsley et al., 1994; Sasaki et al., 2006). Die hier dargestellte Analyse der Oberflächeneigenschaften von LNS Domänen führte zur der Vermutung, daß die spezifischen Funktionen der einzelnen LNS Domänen auf die Sequenzvariationen und lokalen elektrostatischen Eigenschaften in der Umgebung der Calciumbindungsstelle basieren.

3.2.3 Calcium bindet an Neurexin und ist für die Interaktion mit Neuroligin essentiell erforderlich

Die Calciumabhängigkeit der Neurexin-Neuroliginbindung ist seit der Entdeckung der Interaktion bekannt (Nguyen und Südhof, 1997). Da aber Calcium weder das Circular-Dichorismus (CD) Spektrum von Neurexin änderte wie es für z.B. für EF-Hand Proteine typisch ist, noch seine direkte Bindung als Calcium-45 Isotop nachweisbar war, wurde die Calciumabhängigkeit von Neurexin Protein-Protein Interaktionen ausschliesslich einer Calciumbindungsstelle bei den Interaktionspartnern zugeschrieben (Nguyen und Südhof, 1997; Tsigelny et al., 2000). Die durchgeführten Strukturhomologievergleiche der calciumfreien β -Neurexin LNS mit den calciumgebundenen LNS Domänen von Agrin und Laminin haben eine gemeinsame Kernregion identifiziert (Abb. 3-5A), die eine rigide Calciumbindungsstelle auch für Neurexine modellieren lies (Abb. 3-5C). Für den direkten Nachweis der Calciumbindung an Neurexinen wurden Calcium-45 Bindungsstudien durchgeführt (siehe unten), während gezielte Mutationen dazu dienten, den jeweiligen Einfluss von Calcium-koordinierenden Resten zu bestimmen. Hierzu wurde die



Bindungsfähigkeit von Wildtyp und mutierten Neurexin LNS Domänen mit Neurologinen durch eine Immunopräzipitation getestet. Es wurden βD137 und βN238 der isolierten β-Neurexin LNS Domäne (1βLNS) unabhängig voneinander zu Alanin mutiert (Abb. 3-6A). Hierdurch wurden die prosthetischen Gruppen der beiden Seitenketten reduziert, deren Analoga für die Calciumkoordination in Laminin LNS Strukturen verantwortlich sind (Abb. 3-5D). Die vorangegangene Modellierung der Neurexin LNS Domänen hat vermuten lassen, dass die Calciumkoordination und Neurologinbindung an der sechsten LNS6 von α-Neurexin 1 (αLNS6) und an βLNS identisch sind. Zur Überprüfung wurden alle Mutationen und Experimente der βLNS auch an αLNS6 durchgeführt. Vorab wurden die exakten Domänengrenzen der αLNS6 durch einen Cα-Cα Differenzabstandsdiagramm und Differenzramachandranwerten bestimmt und die entsprechend isolierte Domäne zwischen das α-Neurexin Signalpeptid und der Fc-Region des humanem IgG insertiert. Mit diesen Konstrukten wurden COS-7 Zellen transfiziert und die sekretierten Fusionsproteine für die Immunopräzipitation aus dem Kulturmedium geerntet. Beide Wildtyp α- and β-Neurexin LNS Isoformen, die sich nur in einer für β-Neurexin spezifischen N-terminalen Sequenz von 38 Resten unterscheiden (Abb. Anhang (A) 8-2, (Missler und Südhof, 1998)), haben gleichermaßen Neurologinen aus Hirnlysat präzipitiert (Abb. 3-6B, Bahn 3, obere Reihe). Dieses Ergebnis zeigt, dass die sechste LNS Domäne von Neurexin 1α und die einzige LNS

von Neurexin 1 β mit ähnlichen Kapazitäten an Neuroligin binden und dass entgegen anderslautenden Schlussfolgerungen (Boucard et al., 2005) weder eine α EGF3 Region für alpha-Neurexin noch die β -Neurexin spezifischen Reste für diese Interaktion erforderlich sind. Im Gegensatz dazu verhinderten die Alanin-Mutationen der sauren calciumbindenden Reste in Neurexin 1 α LNS6 und Neurexin 1 β LNS den *pulldown* von Neuroligin aus Hirnlysaten (Abb. 3-6B, Bahnen 4-7, obere Reihe) oder von rekombinantem Neuroligin 1 (Daten nicht gezeigt), Neuroligin 2 oder Neuroligin 3 aus COS-7 Zelllysaten (Abb. 3-6C).

Die Calcium-45 Bindungsstudien ergaben, dass α - und β -Neurexin wie auch Neuroligin Calcium binden (siehe unten und Daten nicht gezeigt), während die Alanin- oder Argininmutationen der sauren Reste der vermuteten Calciumbindungsstelle von α -LNS und β -LNS dies verhindern (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Calciumbindung und der komplette Verlust der Neuroliginbindung durch die Mutationen α D1183A, α D1183R, β D137A, β D137R, α N1284A und β N238A bestätigte (i) die Calciumbindung an Neurexin und (ii) klassifizierte die Calciumbindungsstelle am äußeren Rand der LNS Domäne (Abb. 3-5A) als für die Komplexbildung unbedingt erforderlich.

In der Kristallstruktur von Laminin 2 α LNS3 war Calcium im Komplex mit Sulfat an die LNS gebunden (Hohenester et al., 1999). Sulfat könnte als Co-Faktor die Calciumbindung begünstigen und sein Fehlen die beobachtete sehr niedrige Calciumaffinität für isolierte LNS Domänen begründen (Sheckler et al., 2006; Chen et al., 2008; Shen et al., 2008). Von den drei Hydroxylgruppen in Laminin, die zusammen mit Calcium das Sulfat koordinierten, ist nur ein Rest (α T1281 und β T235) in Neurexinen 1 α LNS6 bzw. 1 β LNS konserviert. Durch die Mutation des in α - und β -Neurexinen konservierten Threonins zu Alanin wurde eine mögliche Sulfatbindung unterbunden. Im *pulldown*-Experiment haben die Mutationen α T1281A und β T235A die Neuroliginbindung aus Hirnlysate allerdings nicht beeinflusst (Abb. 3-6B, lanes 8 und 9). Auch in vergleichbaren Experimenten mit rekombinantem Neuroligin 1, Neuroligin 2 oder Neuroligin 3 aus COS-7 Zelllysaten, in denen nur Tris-Puffer, Natrium- und Calciumchlorid eingesetzt wurden, hatten die oben beschriebenen Mutationen Bindungseigenschaften, die denen aus den Hirnlysate *pulldown*-Experimenten entsprachen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse schliessen eine Sulfatbindung an Neurexin LNS Domänen und eine hieraus bedingte Steigerung der Calciumbindungsaffinität nicht aus, zeigen aber, dass für die Neurexin/Neuroligin Komplexbildung neben Calcium keine weitere Komponente (wie Sulfat) erforderlich ist.

Während einige der obigen Mutationen an der Calciumbindungsstelle von Neurexin kürzlich auch in anderen Studien eingesetzt wurden (Tabelle 3-1), so wurden sie in der vorliegenden Arbeit erstmals auch auf ihre Bindungsfähigkeit an die Neuroligin Isoformen 2 und 3 getestet. Interessanterweise differenziert die β T235A Mutation in *pulldown*-Experimenten nicht zwischen den Neuroligin Isoformen 1-3 (Abb. 3-6C) wie es eine Zellkulturstudie vermuten lies (Graf et al., 2006). Demgegenüber führt die Anwesenheit der *splice*-Insertion SS4 in 1 α LNS6 (Daten nicht gezeigt) und 1 β LNS bei allen drei Isoformen zu einer vergleichbar starken Abnahme der Bindungskapazität (Abb. 3-6C, Bahn 4 und Abb. 3-7). Die durchgeführten Veränderungen an Neurexin wirkten gleichermaßen auf die Bindung an Neuroligin Isoformen 1-3.

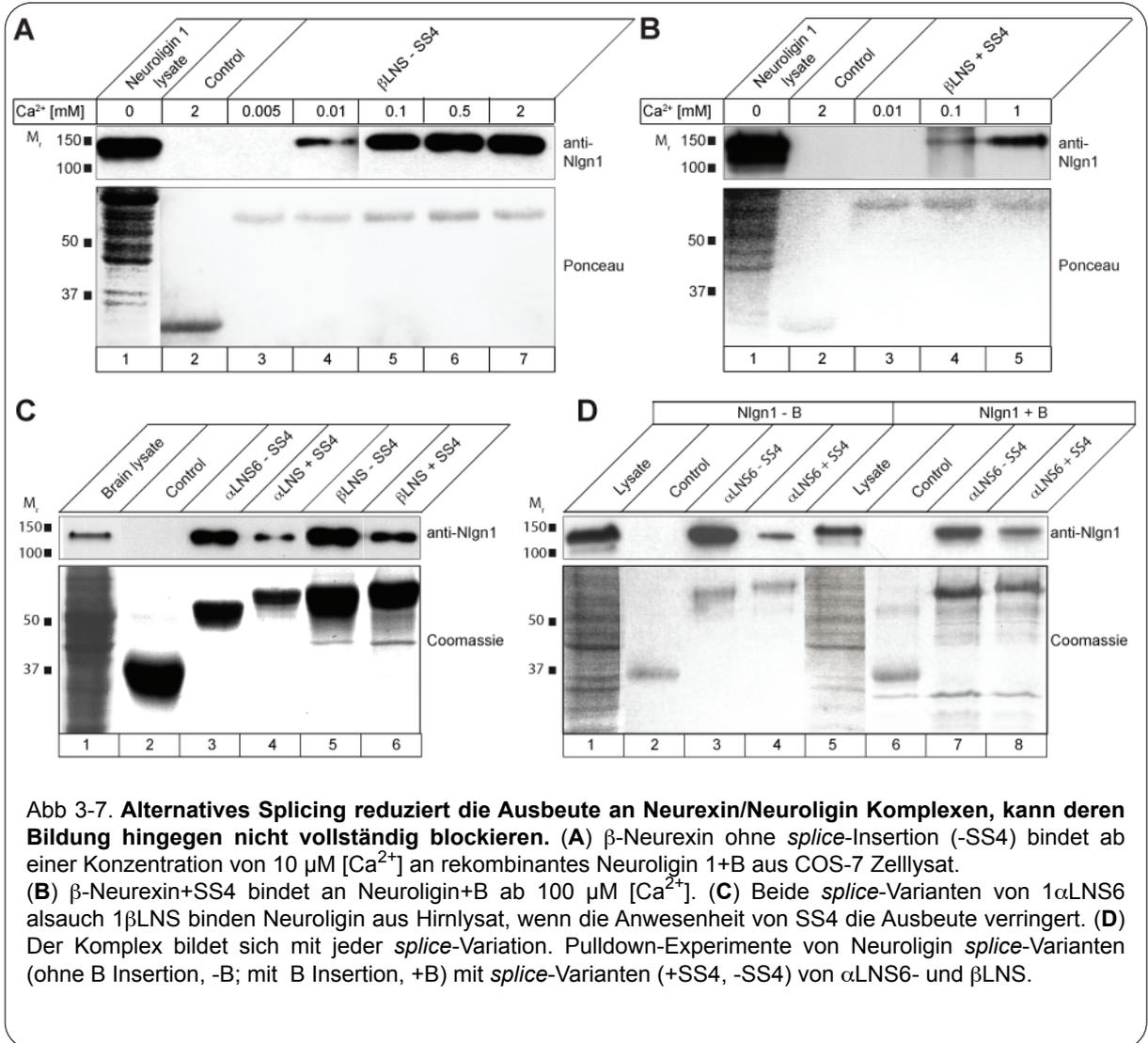
3.2.4 *Splice*-Insertionen sind weder erforderlich noch blockieren sie die Neurexin/Neurologin Komplexbildung

In unabhängigen Studien wurde ein "*splice code*" definiert (siehe Einleitung, Tabelle 1-1), nach welchem nur dann eine Komplexbildung erfolgt, wenn keine oder höchstens eine alternative *splice*-Insertion im Komplex vorhanden ist, entweder von β -Neurexin oder Neurologin (Boucard et al., 2005). In *pulldown*-Experimenten gelang nur die Bindung von β LNS ohne *splice*-Insertion 4 (-SS4) an Neurologine (Nguyen und Südhof, 1997; Hoffman et al., 2004; Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006). Weiterhin band α -Neurexin nur Neurologin 1 ohne *splice*-Insertion B (-B) oder an Neurologin 2 (Boucard et al., 2005). Letzteres besitzt keine alternative *splice*-Insertionsstelle B. Zur Prüfung dieser Bindungspräferenzen, wurden hier erstmals alle Kombinationen von α LNS6 und β LNS mit (+SS4) und ohne SS4 (-SS4) gegen Neurologin 1 mit (+B) und ohne B (-B) unter gleichen Bedingungen in *pulldown*-Experimenten getestet. Zusätzlich wurde die Calciumabhängigkeit der Komplexbildung von β LNS mit SS4 (Abb. 3-7A) und ohne SS4 bestimmt (Abb. 3-7B). Die Anwesenheit der *splice*-Insertion SS4 verhindert im Gegensatz zu den Spezifikationen des *splice*-Code (Tabelle 1-1) die Bindung an Neurologin+B nicht. Allerdings wird eine 10-fach höhere Calciumkonzentration (Abb. 3-7B, Reihe 4) als für β LNS-SS4 (Abb. 3-7A, Reihe 4) erforderlich. Interessanterweise gelang nicht nur erstmals die Bindung von LNS Domänen + SS4 an Neurologine aus Hirnlysaten (Abb. 3-7C, Bahnen 4 und 6), sondern auch dann die Komplexbildung, wenn Neurexin SS4 und Neurologin die Insertion B enthielten (Abb. 3-7D, Bahn 8). Die Bindungskapazität der Komplexe nimmt mit zunehmender Anzahl an *splice*-Insertionen ab, aber ein kompletter Bindungsverlust, wie es die Alaninmutationen von Calciumkoordinierenden Resten gezeigt haben, wird nicht erreicht. Diese Ergebnisse geben die vollständigen *splice*-abhängigen Bindungsmodi von Neurexin und Neurologin 1 wieder und können den beschriebenen *splice code* für β -Neurexin nicht bestätigen.

Demgegenüber konnte hier die von Boucard et al. beobachtete bevorzugte Bindung von α -Neurexinen an Neurologin-B in *pulldown*-Experimenten bestätigt werden, wenn auch die Bindung von α -Neurexin an Neurologin+B in Spuren nachweisbar war und bei einem *pulldown* über Nacht angereichert wurde (Daten nicht gezeigt). Dieses galt aber nur für das Gesamtprotein, während die Präferenzen von α LNS6 und β LNS Domänen für die Bindung an Neurologine identisch waren (Abb. 3-7B und C). Entsprechend kann das Fehlen der 38 β -spezifischen Reste für die stark verminderte Bindung von α -Neurexinen an Neurologin+B nicht verantwortlich gemacht werden. Im Ergebnis beschreibt der *splice-code* ausschliesslich eine Bindungspräferenz von α -Neurexinen für Neurologine ohne Insertion B (Tabelle 1-1), während β -Neurexin unter allen Bedingungen einen Komplex ausbilden kann. Zusammenfassend ist alternatives *splicing* für die Interaktion von Neurexin und Neurologin nicht erforderlich, noch kann es die Komplexbildung vollständig blockieren wie es die Mutationen von an der Calciumkoordination beteiligten Seitenketten gezeigt haben (Abb. 3-6B).

3.2.5 Neurologin bindet auch an eine Neurexinmutation mit niedrigster Calciumaffinität

Eine Erniedrigung der Calciumaffinität von α LNS2 durch *splice*-Insertion SS2 begründete die



Hypothese, dass *splice*-Insertionen generell die Calciumaffinität erniedrigen (Sheckler et al., 2006). Entsprechend könnte eine erniedrigte Calciumaffinität die geringere Bindungskapazität von Neurexin mit *splice*-Insertion SS4 erklären (Abb. 3-6C und 3-7C). Je niedriger die Okkupanz von Calcium an Neurexin, desto geringer die Neuroiginbindung. Entgegen der Erwartung erhöhte SS4 die Calciumaffinität von βLNS gegenüber βLNS-SS4 (Shen et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SS4 die Calciumaffinität im Komplex um das 10-fache erniedrigt (Abb. 3-7B). Die Calciumaffinitäten der isolierten und der komplexierten 1βLNS Domäne scheinen demnach unterschiedlich von der *splice*-Insertion SS4 modifiziert zu werden.

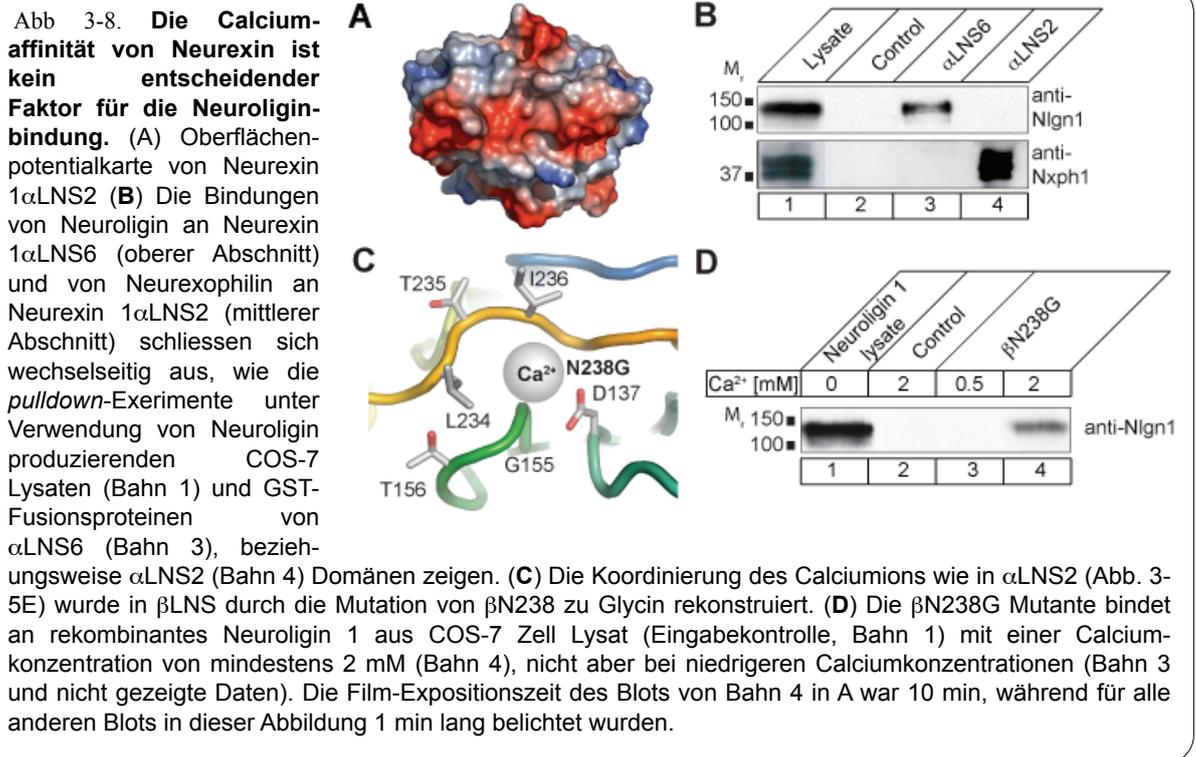
Um den Einfluss der Calciumaffinität auf die Neuroiginbindung weiter zu klären, habe ich versucht, die Calciumaffinität von Wildtyp βLNS drastisch zu reduzieren. In Anlehnung an die Kristallstruktur der zweiten α-Neurexin LNS Domäne (Abb. 3-8A), welche Calcium nur mit einer geringen Affinität band (Sheckler et al., 2006) und nicht mit Neuroigin interagiert (Abb. 3-8B, Bande 4, oberere Reihe), haben ich diese niedrig-affine Calciumkoordination in Neurexin 1 βLNS eingebaut, in dem βN238 zu Glycin mutiert wurde (Abb. 3-8C). Aufgrund der gezeigten Rigidität der Calciumbindungsstelle in diesen LNS

Domänen (Abb. 3-5) sollte diese Mutation keine strukturellen Änderungen bewirken, was sich auch in einer gegenüber dem Wildtyp unveränderten Sekretion des IgG-fusionierten β N238G Proteins bemerkbar machte (Daten nicht gezeigt). Während die Mutante β N238A die Neuroliginbindung wie oben gezeigt komplett verhindert (Abb. 3-6B, Bande 7), kann die Mutante β N238G überraschenderweise Neuroligin binden (Abb. 3-8D, Bande 4). In Analogie zur α LNS2 (Abb. 3-5E und Sheckler et al., 2006) scheint auch bei β N238G ein Wassermolekül die fehlende Carboxamidgruppe des Asparagin funktionell zu ersetzen und Calcium zu koordinieren. Auch wenn die Interaktion mit β N238G eine Calciumkonzentration von mindestens 2 mM im Vergleich zu den 10 μ M für Wildtyp- β LNS benötigt, so zeigt dieses Ergebnis, dass auch eine 200-fach niedrigere Calciumaffinität für die Neuroliginbindung ausreicht. Diese Calciumaffinität des Neuroligin-Komplex mit β N238G ist immer noch 20-fach geringer als sie im Komplex mit β LNS+SS4 erniedrigt wird (Abb. 3-7B).

Schlussfolgernd kann die in Neurexin LNS Domänen unterschiedliche Calciumaffinität und deren relativ moderate Änderung durch *splice*-Insertionen (Abb. 3-7B und Koehnke et al., 2008; Shen et al., 2008; Sheckler et al., 2006) die exklusive Bindung von Neuroligin an α LNS6 und β LNS nicht hinreichend erklären. Die Neurexin 1 α LNS2, welche im Komplex eine ähnliche Calciumaffinität besitzen sollte wie die β N238G Mutation, bindet selbst nicht an Neuroligine, wohl aber als Kontrolle an ihren endogenen Bindungspartner Neurexophilin (Abb. 3-8B, Bande 4, mittlerer Abschnitt), so dass es weitere Faktoren geben muss, die neben der Calciumkorrdination erforderlich sind.

3.2.6 Die Neuroliginbindung erfolgt über hydrophobe Reste

Die obigen Analysen ergaben, dass sich die Oberflächeneigenschaften um die Calciumbindungsstelle der α LNS6 sehr von denen der anderen LNS Domänen unterscheidet (Abb. 3-4K). Im Folgenden wurde der Einfluß auf die Neuroliginbindung von den Resten untersucht, die nicht an der Calciumbindung oder den *splice*-Stellen beteiligt sind, aber die Form und die elektrostatischen Eigenschaften dieser Oberflächenregion mitbestimmen. Mit Hilfe von gezielten Mutagenesen zur Bestimmung der Neuroliginbindung und Calcium-45 *Overlay*-Experimenten zur Überprüfung der Integrität der Calciumbindungsstelle in Wildtyp und mutanten Domänen, wurde als erstes der Einfluß der zwei langen hydrophoben Reste Leu234 und Ile236 untersucht (Abb. 3-9A und C, grün). Die dreifache Mutation an den α LNS6 (α L1280S+I1282S+N1284D) und β LNS (β L234S+I236S+N238D) Domänen entspricht der Calciumkoordination von Laminin 2 α LNS5 (Abb. 3-4D), entfernt aber den für die letzte Neurexin LNS Domäne spezifischen hydrophoben Ring um die Calciumbindungsstelle (Abb. 3-4K). Als Folge dieser Mutationen wird die Neuroliginbindung komplett unterbunden (Abb. 3-9A, Bahnen 4 und 5, obere Reihe), während die Calciumkoordination erhalten bleibt (Abb. 3-9A, mittlere Reihe). Die Erfordernis von hydrophoben Resten an der Neuroliginbindungsstelle in α LNS6 und β LNS läßt eine direkte Interaktion mit korrespondierenden hydrophoben Resten auf Seiten von Neuroligin vermuten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine sterische Blockade für diese potentielle Neuroliginbindungsstelle eingefügt, indem die konservierten Reste α G1201 und β G155 zu Valin mutiert wurden. Beide mutierten LNS Domänen können nicht mehr an Neuroligine



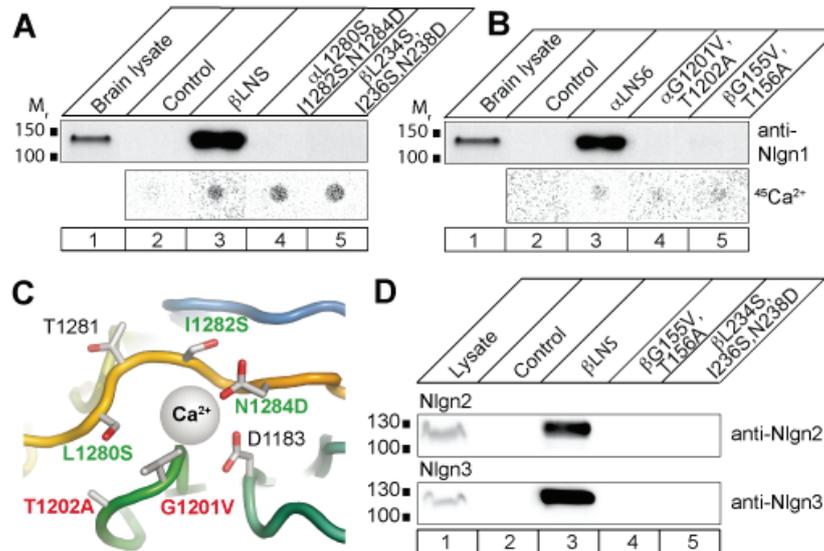
binden, sind aber weiterhin in der Lage Calcium zu koordinieren (Abb. 3-9B, Bahnen 4 und 5, oberere und mittlere Reihe). Die Valinmutationen wurden gemeinsam mit α T1202A, bzw. β T156A, durchgeführt, um einem möglichen sterischen Kontakt der Methylgruppen von Valin und Threonin und einer daraus folgenden Änderung im Hauptkettenverlauf entgegenzuwirken (Abb. 3-9C, rot). Die isolierte β T156A Mutation ist bereits in unabhängigen Studien getestet worden und zeigte keine Veränderung in der synaptogenetischen Wirkung von β -Neurexin (Graf et al., 2006). Der komplette Bindungsverlust der Doppelmutationen wird demnach maßgeblich durch die Seitenkettenverlängerung an der Glycinposition verursacht.

Durch diese Experimente werden α G1201, α L1280 und α I1282 in α -Neurexin, sowie β G155, β L234 und β I236 in β -Neurexin als direkt an der Neuroligin 1 Kontaktstelle beteiligte Reste identifiziert, die zusätzlich zur Calciumbindung an Neurexin für die Komplexbildung erforderlich sind. Zur Prüfung, ob die Neuroligin 1 Kontaktstelle auf Neurexin auch andere Neuroliginisoformen bindet, wurden *pull-down*-Experimente auch mit Lysaten von COS-7 Zellen durchgeführt, die jeweils rekombinantes Neuroligin 2 oder 3 produzierten. Im Ergebnis, führten die Mutationen an den hydrophoben Resten β L234S und β I236S (β L234S+I236S+N238D) wie auch die Oberflächenerweiterung an β G155V+T156A zu einem kompletten Bindungsverlust mit diesen Isoformen (Abb. 3-9D). Diese Ergebnisse wurden auch für entsprechende Konstrukte von α -Neurexin und in gleicherweise bei Verwendung von COS-7 und Hirnlysaten erhalten (Daten nicht gezeigt). Die hydrophobe Kontaktstelle auf Neurexin bindet somit in identischer Weise die Neuroliginisoformen 1 bis 3.

Zur Untermauerung der gezeigten Daten wurde die Bindungsfähigkeit der in den *pull-down*-Experimenten eingesetzten rekombinanten Neurexin LNS Proteine auch an Membran-gebundenes Neuroligin *in vivo* getestet. Lebende tsA201 Zellen, die C-terminal

Abb 3-9. Neurologin bindet an hydrophobe Seitenketten von Neurexin.

(A) Neurologine aus Mäusehirnlysat (Bahn 1) werden mittels Wildtyp Neurexin 1 β LNS (Bahn 3) oder der Wildtyp Neurexin 1 α LNS6 (B, Bahn 3), aber nicht durch die 1 α LNS6 Mutante α L1280S+I1282S+N1284D (Bahn 4) oder der entsprechenden Mutation in Neurexin β L234S+I236S+N238D (Bahn 5) präzipitiert. Calcium-45 Western-dot-blots unter Verwendung von rekombinanten LNS Domänen (mittlerer Abschnitt) zeigen, daß die Calciumbindung auch bei den



mutanten stattfindet, die Neurologin nicht präzipitieren (Bahnen 4 & 5). (B) Eine artifizell erweiterte Oberfläche blockiert die Bindung von Neurologinen and die mutierten Neurexin 1 α LNS6 (Bahn 4) und Neurexin 1 β LNS Domänen (Bahn 5), während die Calciumbindung erhalten bleibt wie die Western-dot-blots zeigen (mittlerer Ausschnitt). (C) Stellen der Mutationen. Durch die Mutationen α L1280S+I1282S+N1284D (grün) und β L234S+I236S+N238D (nicht gezeigt) wird die Calciumkorrdination wie in Laminin 2 α LNS5 erhalten (Abb. 3-5D) und gleichzeitig der hydrophobe Ring um die Calciumbindungsstelle entfernt (Abb. 3-5K). Die sterische Blockade der Kontaktfähigkeit der vermuteten Neurologinbindungsstelle wurde durch den Einbau einer langen sperrigen Seitkette an Stelle des konservierten Glycins durch die Doppelmutationen α G1201V+T1202A (rot) und β G155V+T156A (nicht gezeigt) erreicht. Durch die gleichzeitige Entfernung der Threonin Hydroxylgruppe wurde für das eingebaute Valin der nötige Platz geschaffen, und die Gefahr eines möglicherweise veränderten Hauptkettenverlauf minimiert.

(cytosolisch) GFP-markiertes Neurologin produzieren, wurden mit löslichen IgG-Neurexin 1 β LNS Fusionsproteinen inkubiert und deren IgG Fc Region mit Fluoreszenz-markiertem Protein A visualisiert. Als Beispiel konturieren Wildtyp Neurexin β LNS und die Mutante β T235A (rot in Abb. A 8-3A-B) jeweils die Plasmamembran in den Bildüberlagerungen, was eine Oberflächenbindung an Membran-gebundenem Neurologin nachweist. Im Gegensatz hierzu findet keine Oberflächenmarkierung durch die Doppelmutation β G155V+T156A statt (Abb. A 8-3D). Diese Daten und weitere nicht gezeigte Zellkultorexperimente bestätigten die Ergebnisse aus den biochemischen *pull-down*-Experimenten und zeigen, das die Reste, die für die Neurologinbindungsstelle als essentiell erforderlich sind, auch physiologisch für die Erhaltung der transsynaptischen Signalkette über den Neurexin/Neurologin Komplex signifikant sind.

3.2.7 Neurexinbindungsstelle von Neurologin - Modellbau und gezielte Mutagenesen an Neurologin zur Findung der Neurexinbindungsstelle

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die degenerative EF Hand 1 von Neurologin nicht an der Neurexinbindung beteiligt ist (Abb. 3-4), wurde die Neurologinstruktur anhand mehrerer Acetylcholinesterasestrukturen modelliert (Abb. 3-10A) und nach potentiellen Neurexinbindungsstellen auf der Proteinoberfläche gesucht, die zur oben beschriebenen hydrophoben Neurologinbindungsstelle auf Neurexin kompatibel waren. Für jede der

insgesamt vier ausgewählten Stellen wurde ein Neurexin/Neurologin-Komplexmodell erstellt (Tabelle A 8-1) und nachfolgend durch gezielte Mutagenesen auf seine Richtigkeit überprüft.

Die Auswahl der gezielten Mutagenesestellen erfolgte auf der Basis der Strukturkoordinaten der Neurexin β LNS (pdb: 1c4r) und Acetylcholinesterasen (1fss, 1mah). Mit den kürzlich erschienenen Publikationen von β -Neurexin/Neurologin-Kristallstrukturen konnten die Modellierungen qualitativ bewertet und die angewandten Methoden optimiert werden. Die Strukturen der im Komplex gebundenen und der freien β LNS sind nahezu deckungsgleich (RMSD $< 1 \text{ \AA}$) und lassen keine Konformationsänderung aufgrund von Calcium- oder Komplexbindung erkennen. Die Neurexin-gebundenen und freien Neurologinstrukturen zeigten ebenfalls keine Konformationsänderungen, die auf die Bindung zurückzuführen wären (RMSD ohne Schleifen $< 2 \text{ \AA}$). Es sind maßgeblich exponierte Schleifen, die in den Strukturen divergieren und von denen sich die *splice*-Insertion A und die Schleife L34 aufgrund fehlender Elektronendichte als sehr flexibel darstellten (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Chen et al., 2008). Die Neurologin Modellstrukturen entsprachen dementsprechend sehr gut den Kristallstrukturen von Neurologin (Abb. 3-10B). Die maßgebliche Abweichung im Modell lag in der Konformation der Omega-Schleife (Fabrichny et al., 2007). Diese ragt in den Kristallstrukturen überraschenderweise in das inaktive Zentrum der CAM-Domäne hinein (Chen et al., 2008). Eine Modellierung dieser Schleife in die tiefe Bindungstasche des inaktiven Zentrums ist mit den angewandten bioinformatischen Methoden nicht möglich und hätte nur manuell erfolgen können. Für letzteres fehlten jegliche experimentelle Indizien. Sowohl die LNS als auch die CAM Domänen besitzen rigide Kernstrukturen (Abb. 3-4A und 3-10C). Im Gegensatz zur rigiden Calcium- und Neurologinbindungsstelle der Neurexin α LNS6 und β LNS Domänen, ist die Neurexinkontaktfläche von Neurologin nicht Teil dessen Kernstruktur und divergiert sogar stark zwischen Neurologin 1 und 4 (RMSD (G500): 3.3 \AA). Die Neurologin 1 Strukturen, die mit und ohne Neurexin kristallisiert wurden, zeigen keine Differenzen, so dass für die Neurexinbindung keine induzierte Konformationsänderung abgeleitet werden kann. Diese Analyse zeigt, dass die Modellstrukturen der Einzeldomänen bereits sehr gut mit den später gelösten Kristallstrukturen übereinstimmten. Ein Modellkomplex (mit L399 an der Kontaktstelle, siehe unten) hat die Neurexinbindungsstelle auf Neurologin 1 korrekt bestimmt, wenn auch die β LNS Domäne so orientiert wurde, dass die *splice*-Insertionen B und SS4 direkt miteinander interagierten (Fairless et al., 2006), während die späteren Kristallstrukturen eine derartige Interaktion ausschlossen (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Chen et al., 2008).

Die Alternativen *splice*-Insertionen von Neurexin und Neurologin wurden ebenfalls in die Modelle eingebaut und diejenigen Modellkomplexe ausgewählt, die, wie die obigen Ergebnisse gezeigt haben, ein Vorhandensein von allen Insertionen, Neurologin A und B und Neurexin SS4, erlaubten. Die Insertionen wurden ferner so plaziert, dass sie die Faltung der jeweiligen Domäne nicht veränderten, sondern nur die Schleife verlängerten in der sie insertiert wurden. Die kürzlich gelösten Neurexinstrukturen mit SS4 bestätigten, dass SS4 die Faltung der LNS Domäne nicht veränderte (Shen et al., 2008).

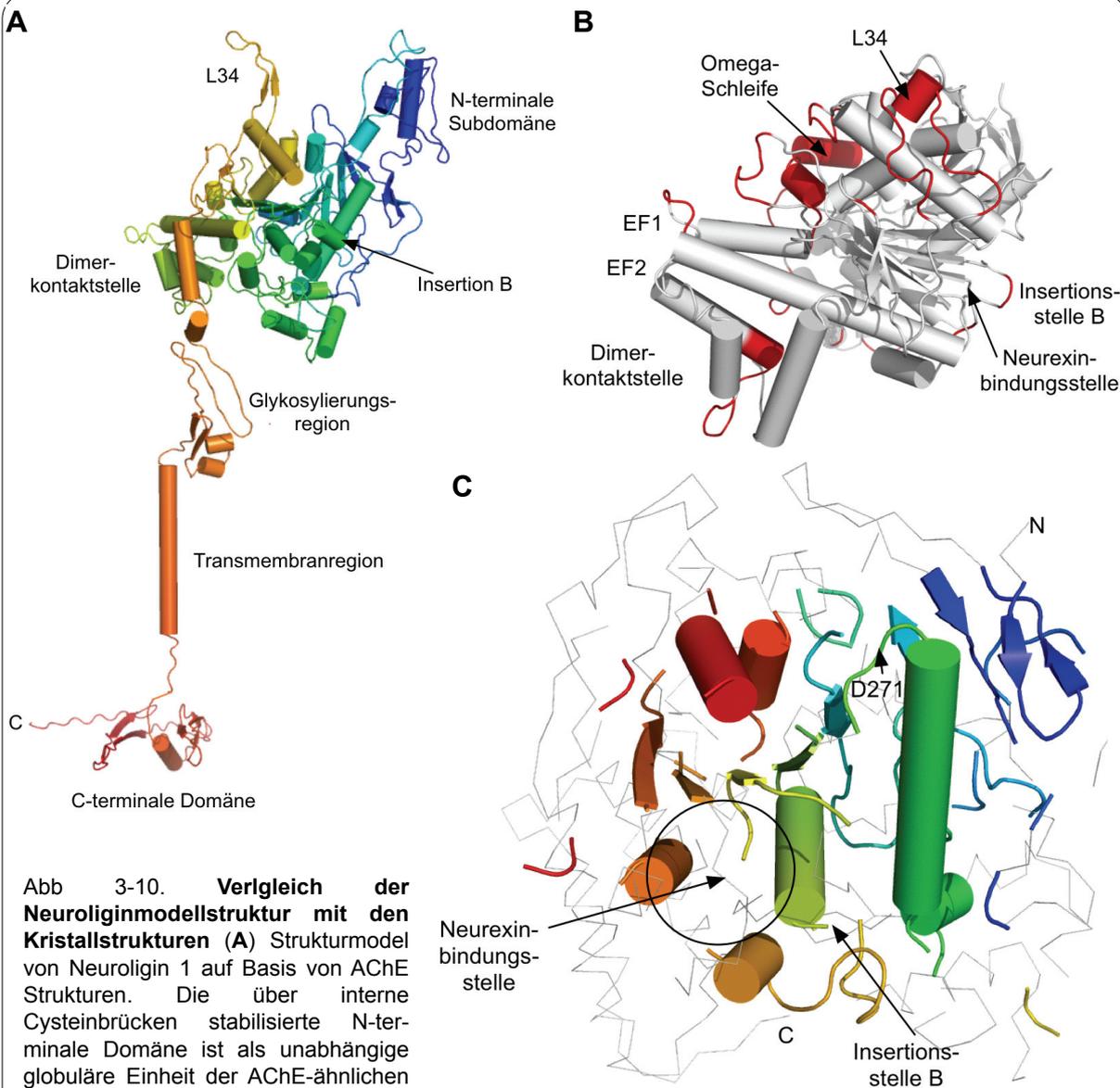


Abb 3-10. **Vergleich der Neuroiginmodellstruktur mit den Kristallstrukturen** (A) Strukturmodell von Neuroigin 1 auf Basis von AChE Strukturen. Die über interne Cysteinbrücken stabilisierte N-terminale Domäne ist als unabhängige globuläre Einheit der AChE-ähnlichen Domäne aufgesetzt. Die Region zwischen der AChE-ähnlichen Domäne und der Transmembranregion ist stark glykosyliert. Die hier dargestellte kompakte Anordnung müsste für die Komplexbildung von Neurexin und Neuroigin entfaltet werden, damit der synaptische Spalt (16-20 nm) überbrückt werden kann. (B) Das Modell und die Kristallstrukturen von Neuroigin unterscheiden sich ausschliesslich in den Neuroigin-spezifischen Schleifenregionen (RMSD Werte größer 1.3 Å sind rot markiert, PDB: 1bix). Die größte Differenz liegt in der Konformation der Omega-Schleife. Diese ragt in das inaktive Zentrum der Kristallstruktur hinein, während sie im Modell oberflächenexponiert ist. Die sehr flexible Schleife L34 kann sowohl exponiert sein (Modell in A) als auch an der Domäne anliegen (Kristallstruktur). Demgegenüber stimmen im Modell alle putativen Bindungsstellen wie die EF Hände oder die Neurexinbindungsstelle mit der Kristallstruktur überein. (C) Die rigide Kernregion von AChE-ähnlichen Domänen (RMSD < 1 Å). Die Topologie ist durch ein 9-strängiges Betafaltblatt und 7 angrenzende Helices gekennzeichnet. Die Neurexinbindungsstelle ist nicht Teil der Kernstruktur, da die Region um G500 bis zu 3.3 Å und die Region As. 397-400 bis zu 4.7 Å divergieren. Auch innerhalb der Neuroiginstrukturen divergieren die Positionen der an der Neurexinbindung beteiligten Reste bis zu 3.3 Å. Die Region um D271 ist demgegenüber konserviert und in allen AChE-ähnlichen Strukturen identisch gefaltet.

Die Region zwischen der AChE-ähnlichen Domäne und der Transmembranregion ist stark glykosyliert. Die hier dargestellte kompakte Anordnung müsste für die Komplexbildung von Neurexin und Neuroigin entfaltet werden, damit der synaptische Spalt (16-20 nm) überbrückt werden kann. (B) Das Modell und die Kristallstrukturen von Neuroigin unterscheiden sich ausschliesslich in den Neuroigin-spezifischen Schleifenregionen (RMSD Werte größer 1.3 Å sind rot markiert, PDB: 1bix). Die größte Differenz liegt in der Konformation der Omega-Schleife. Diese ragt in das inaktive Zentrum der Kristallstruktur hinein, während sie im Modell oberflächenexponiert ist. Die sehr flexible Schleife L34 kann sowohl exponiert sein (Modell in A) als auch an der Domäne anliegen (Kristallstruktur). Demgegenüber stimmen im Modell alle putativen Bindungsstellen wie die EF Hände oder die Neurexinbindungsstelle mit der Kristallstruktur überein. (C) Die rigide Kernregion von AChE-ähnlichen Domänen (RMSD < 1 Å). Die Topologie ist durch ein 9-strängiges Betafaltblatt und 7 angrenzende Helices gekennzeichnet. Die Neurexinbindungsstelle ist nicht Teil der Kernstruktur, da die Region um G500 bis zu 3.3 Å und die Region As. 397-400 bis zu 4.7 Å divergieren. Auch innerhalb der Neuroiginstrukturen divergieren die Positionen der an der Neurexinbindung beteiligten Reste bis zu 3.3 Å. Die Region um D271 ist demgegenüber konserviert und in allen AChE-ähnlichen Strukturen identisch gefaltet.

3.2.8 Gezielte Mutagenesen zur Überprüfung der Neurexin/Neuroigin Modelle

In dieser Arbeit wurde erstmals die direkte Calciumbindung an α LNS6 und β LNS nachgewiesen (Abb. 3-9B und D) und zudem gezeigt, dass hydrophobe Reste zusätzlich zur Calciumbindung für die Interaktion essentiell erforderlich sind (Abb. 3-9). Das ließ vermuten,

dass auf der Neuroliginoberfläche ebenfalls hydrophobe Reste die Neurexinkontaktstelle auskleiden. Womöglich beteiligt sich auch eine saure Neuroliginseitenkette an der Koordination des an Neurexin gebundenen Calciums. Zur Identifizierung dieser Reste wurden anhand dieser Vorgaben vier Strukturmodelle von Neurexin/Neuroligin-Komplexen modelliert (Tabelle A 8-1), von denen bereits eines in einem Übersichtsartikel publiziert wurde (Fairless et al., 2006). Zur Auswahl eines geeigneten Komplexmodells wurden gezielte Mutagenesen an den Kontaktstellen durchgeführt, die zu einem kompletten Verlust der Neurexinbindung führen sollten.

Das erste Modell erlaubte eine Überbrückung des synaptischen Spaltes ohne dass die stark O-glykosylierten Peptidabschnitte zwischen der Transmembranregion und der jeweiligen Domäne in Neurexin und Neuroligin zur Verlängerung entfaltet werden müssen (Fairless et al., 2006). Für dieses Modell wurden A557 und V558, welche die hydrophobe Kontaktstelle für Neurexin auskleideten, zu Asparagin und Arginin mutiert. Beide Reste kommen in der zu Neuroligin homologen Sequenz von Acetylcholinesterasen vor und diese Mutationen sollten in entsprechenderweise Neurexin nicht binden (Scheiffele et al., 2000; Comoletti et al., 2003). Entgegen dieser Erwartung verändern die Mutationen weder die Calciumabhängigkeit der Komplexbildung mit 1 β LNS (Abb. 3-11, untere Reihe), noch wird der Proteintransport beeinflusst und ein IgG-Neuroligin 1 A557D+V558R wurde aus COS-7 sekretiert und konnte Wildtyp-Neurexine erfolgreich in *pulldown*-Experimenten binden (Daten nicht gezeigt). Mit diesen Ergebnissen wird das erste Komplexmodell nicht verifiziert.

Im zweiten Modell bindet Neurexin an eine Prolin-reiche Sequenz um das konservierte E99, welches in einem derivatisierten Acetylcholinesterasekristall Zink gebunden hatte (Harel et al., 1995). Die Mutation des benachbarten P100 zu Serin sollte einen direkten Kontakt zu Neurexin sterisch unterbinden und die Peptidebene von E99 für eine Calciumkoordination ungünstig orientieren. Die Neuroligin 1 P100S Mutation verhindert die Komplexbildung nicht (Abb. 3-11A, Bahn 6), so dass auch dieses Bindungsmodell ausgeschlossen werden kann.

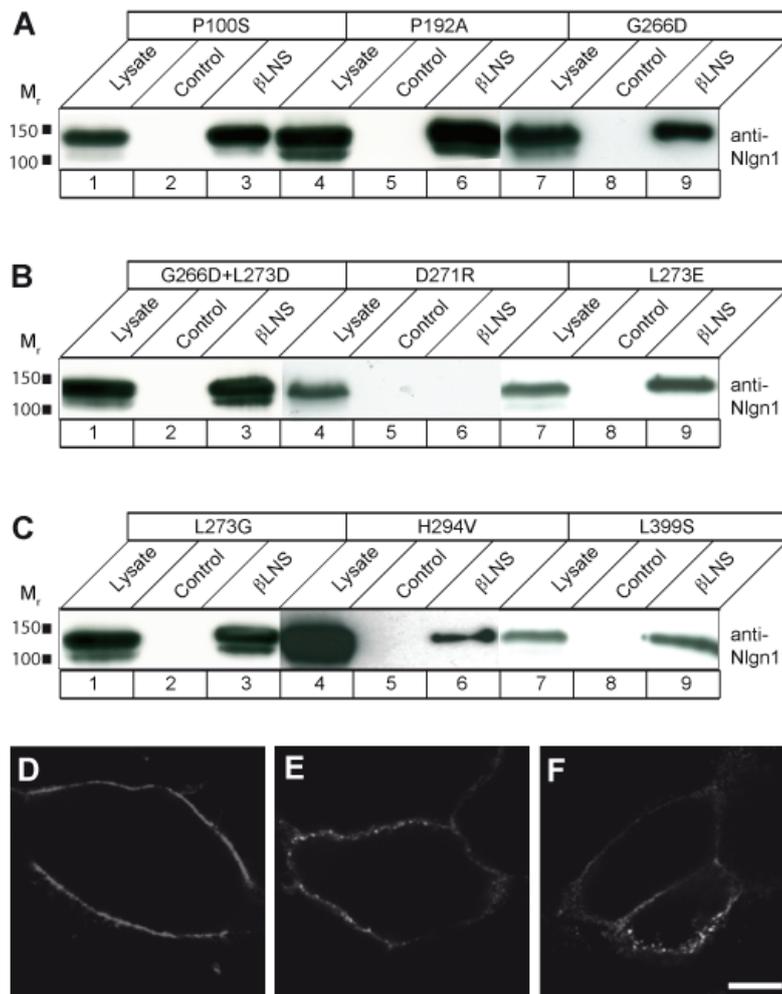
In der Nähe zur *splice*-Insertion B befinden sich im Neuroliginmodell die zwei sauren Reste Q395 und E397, welche einem ungewöhnlich exponierten hydrophoben Rest (L399) benachbart sind. Im dritten Komplexmodell koordiniert E397 das Neurexin-gebundene Calcium und Neuroligin 1 L399 interagiert mit β G155. Entgegen der Erwartung, dass die Mutation L399S entsprechend β G155V die Komplexbildung verhindert (Abb. 3-9B, Bahn 9), bindet L399S an Neurexin (Abb. 3-11C, Bahn 9). Auch die Mutation H294V eines Histidin, welches wie bei Gas6 an der Calciumbindungstelle beteiligten sein könnte (Sasaki et al., 2006), beeinflusste die Neurexinbindung nicht (Abb. 3-11C, Reihe 6). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Neurexin nicht nahe L399 bindet.

Im vierten Modell sind die Oberflächen von Neurexin und Neuroligin kongruent zu einander. Wie β D137 in β -Neurexin ist das konservierte zentrale Neuroligin D271 von hydrophoben Resten umgeben. D271 liegt zwischen den *splice*-Insertionen A und B, sowie der Schleife L34. Für eine Neurexin Bindung an D271 spricht, dass diese drei Regionen Neuroligin-spezifisch sind und bei Anwesenheit schon einer dieser Schleifen die Ausbeute in *pulldown*-Experimenten reduziert wird (Daten nicht gezeigt und Comoletti et al., 2003). Die Mutation von D271 zu Arginin erhält die Funktionalität des Proteins, da es an die Oberfläche

Abb. 3-11. Neuroligin D271R blockiert die Neurexinbindung.

(A-C) Pulldown von verschiedenen gezielt mutierten Neuroligin 1 Derivaten aus COS-7 Zelllysaten mit IgG-bLNS und IgG Protein als Kontrolle. Die Mutationen wurden an 3 verschiedenen Regionen nahe der splice-Insertionstelle B plziert, die allerdings nur in der H294 Mutation, einem Derivat von Neuroligin+B, vorhanden war. Die erste Region enthält P100, durch dessen Mutation zu Serin sollte ein naher Kontakt von Neurexin unterbunden und der Hauptkettenverlauf des Polyprolinstrangs (As. 97-103) ungünstig verändert werden. Die Neurexinbindung wird allerdings durch P100S nicht beeinträchtigt, so daß weder P100 noch das konservierte E99 an der Komplexbildung beteiligt zu sein scheint, obgleich E99 in einer derivatisierten Acetylcholinesterasestruktur Zink als Calcium-Analoga gebunden hatte (PDB: 1fss). Die zweite Stelle würde durch ein Aspartat charakterisiert, welches von den hydrophoben Resten P192, G266, und L273 umgeben

ist, wobei die letzt genannten zwei Reste im modellierten Neurexin/Neuroligin Komplex mit I236 und G155 von Neurexin interagieren, während D271 Calcium koordiniert. Im Einklang mit diesem Modell, blockiert die Mutation von D271R gänzlich die Bindung von Neurexin (B, Bahn 6). Allerdings beeinflusst weder eine Mutation der umgebenden hydrophoben Reste zu großen und geladenen Resten (G266D, A, L273E, B, beide Bahn 9), noch die Doppelmutation G266D+L273D (B, Bahn 3) die Bindung von Neurexin an Neuroligin. Diese Ergebnisse zeigen, dass D271 nicht in engem Kontakt zu Neurexin steht. Zuletzt wurde eine andere hydrophobe Region untersucht, die neben dem ungewöhnlich exponierten L399 auch mögliche Calciumkoordinatoren wie E397 enthält. Aber keine der Mutationen H294V (C, lane 6) und L399S (C, lane 9) verändert die Neurexinbindung. (D-F) TsA201 Zellen, die Wildtyp oder mutiertes Neuroligin 1 ohne splice-Insertion B (Nlgn1-B) produzieren, wurden live mit dem Antikörper 4C12 markiert: Wildtyp Nlgn 1 (D), Nlgn1-B G266D (E), Nlgn1-B D271R (F). Skalierung = 5 µm.



von tsA201 Zellen transportiert wird (Abb. 3-11F). Dem Strukturmodell folgend blockiert die Mutation D271R die Bindung an Neurexin (Abb. 3-11B, Reihe 6). Damit ist D271R die erste Neuroliginmutation, die die Neurexinbindung komplett verhindert, aber dennoch den sekretorischen Transportweg passiert. Zur weiteren Prüfung dieser Stelle wurden sterische (P192A, G266D) und die Polarität verändernde Mutationen (L273E) wie auch eine Doppelmutation (G266D+L273D) der umgebenden hydrophoben Reste in Bindungsstudien getestet und überraschend festgestellt, dass sie die Neurexinbindung nicht beeinflussen (Abb. 3-11A, Reihen 6 und 9, B, Reihen 3 und 9, C, Reihe 3). Somit wurde mit D271 zwar ein essentieller Rest für die Neurexin/Neuroligin Komplexbildung identifiziert, der aber scheinbar nicht in einem direkten Kontakt zu Neurexin steht.

3.2.9 Analyse der Mutationen des Neurexin/Neuroigin Komplexes auf Basis der Strukturdaten

Die Kristallstrukturen des Neurexin/Neuroigin-Komplexes (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Chen et al., 2008) haben die gleiche β -Neurexinbindungsstelle auf Neuroigin 1 und 4 bestimmt und die Reste L399 und H294 als direkte Bindungspartner identifiziert (Chen et al., 2008), obwohl keiner dieser Reste bei den oben beschriebenen *pulldown*-Experimenten einen Einfluss auf die Bindung hatte (Abb. 3-11C, Bahnen 6 and 9). Um die Beteiligung von diesen und weiteren Resten der Kontaktstelle (Abb. 3-12) an der Komplexstabilität zu bestimmen, wurden mit Hilfe des Programms FoldX (<http://foldx.crg.es/>) die Bindungsenergien für Wildtyp und mutierte β -Neurexin/Neuroigin 1 Komplexe berechnet und mit allen bisher publizierten experimentellen Daten verglichen (Abb. 3-13 und Tabelle 3-1 und 3-2). Im Ergebnis werden die experimentellen Daten bestätigt (Tabelle A 8-2) und die die Neuroiginbindung verhindernden β -Neurexin Mutationen β S107R, β L135R, β G155V+T156A, β L234S+I236S+N238D, β I236R und β N238R haben positive Bindungsenergiewerte, entsprechend einer endothermen, nicht-bindenden Reaktion. Bis auf die β L234S+I236S+N238D Mutation blockieren die anderen Mutationen den Komplex durch zu große sterische Seitenketten, was sich an positiven $\Delta\Delta G$ Werten (Differenz von ΔG gegenüber dem Wildtyp-Komplex) für überlappende van der Waals Radien (*vdW clash*) bemerkbar macht (Tabelle A 8-3). Es sei angemerkt, dass bei den FoldX Berechnungen die Calciumbindung nicht berücksichtigt wird. Interessanterweise müsste die Bildung des Neurexin/Neuroigin-Komplex aufgrund seines negativen ΔG Wertes auch ohne Calcium erfolgen. In diesem Zusammenhang wird verständlich, dass Mutationen des Calcium-bindenden Restes β D137 zu Alanin und Arginin keine Veränderung in den Bindungsenergiewerten liefern, obgleich sie ebenfalls zu einem kompletten Bindungsverlust führen (Abb. 3-6B). Die unveränderten $\Delta\Delta G$ Werte bei komplettem Bindungsverlust markieren die exklusive Funktion von β D137 als Calcium-Koordinator. Im Gegensatz zu β D137 band β N238 zusätzlich zur Calciumkoordination an den Carbonylsauerstoff von Neuroigin F398 (Chen et al., 2008), was sich durch einen leichten Verlust von $\Delta\Delta G$ für β N238G und β N238A bemerkbar macht.

Die energetische Beteiligung der Seitenketten an der Komplexbildung und die Identifikation von *hot spot* Resten wurde durch das Alanin-Scan Verfahren (Moreira et al., 2007) bestimmt und für alle an der Kontaktstelle beteiligten Reste die ΔG Werte einer Alaninmutationen berechnet. Durch einzelne Alaninmutationen wurden keine positiven ΔG Werte erhalten, doch wurde der Komplex destabilisiert und $\Delta\Delta G$ Verluste bis zu 2 kcal/mol (für β L236A) errechnet. Die $\Delta\Delta G$ Werte wurden farblich auf die Kontaktoberflächen der Neurexin- und Neuroiginstrukturen skizziert (Abb. 3-13B). Auffälligerweise destabilisieren nur Alanin-Mutationen der hydrophoben Reste β L135, β L234, und β I236 den Komplex mit mehr als 1 kcal/mol, während der Verlust polarer Wechselwirkungen von β S107 oder β R232 keinen Einfluß auf die Komplexstabilität ausübt. Im Gegensatz zu den oben genannten Neurexinmutationen liessen sich für keine der experimentell getesteten Neuroiginmutation, einschließlich der fünf-fachen L399A+N400A+D402N+Q395A+E397A (Arac et al., 2007), positive ΔG Werte errechnen (Tabelle A 8-3). Nur die Neuroiginreste L399 und G500 werden als *hot spots* definiert (Abb. 3-13B), da deren Alaninmutationen einen $\Delta\Delta G$ Verlust von mehr

Tabelle 3-1. Übersicht der Mutationen in Neurexin LNS Domänen. Der Einfluß der Mutation auf den Nrnx/Nlgn Komplex wurde durch drei Methoden bestimmt: (i) Neuroliginbindung (+) oder Nicht-Bindung (-) aus biochemischer Sicht; (ii) Synapsenbildung in Zellkultur hauptsächlich nachgewiesen durch Gephyrin/PSD95-Clusterbildung; und (iii) Berechnung der freien Energie (ΔG) durch das Programm FoldX auf Basis von Kristallstrukturen (Chen et al., 2008) mit negativen ΔG Werten, die eine Bindung (+) und positiven Werten, die eine Nicht-Bindung (-) kennzeichnen. Sequenznummerierung folgt dem SWISSPROT Eintrag NXN1A_RAT (Nrnx 1 α) und NXN1B_RAT (Nrnx 1 β); die Regionen sind entsprechend der LNS Kernstruktur bezeichnet (Fig. 3-5A); n.d. = nicht detektiert.

Position	Aminosäure	Mutation	Region/Funktion	Neuroligin Bindung	Synapsenbildung	FoldX	Referenz
Neurexin 1α							
1183	D	A	Ca ²⁺ coord.	-	-	+	hier, (1)
	D	R	Ca ²⁺ coord.	-	n. d.	+	hier
1201-1202	GT	VA	nahe der Ca-Stelle	-	n. d.	+	hier
1280, 1282, 1284	L, I, N	SSD	Laminin 2 α -ähnl. Ca ²⁺ coord.	-	n. d.	-	hier
1281	T	A	Sulfat-bindung	+	n. d.	+	hier
1284	N	A	Ca ²⁺ coord.	-	n. d.	+	hier
	N	G	α LNS2-like Ca ²⁺ coord.	+	n. d.	+	hier
	N	R	Ca ²⁺ coord.	-	n. d.	-	hier
Neurexin 1β							
103-106	NDRP	AAAA	Schleife β 2 β 3	n. d.	+	+	(2), hier
107-109	STR	AAA	Schleife β 2 β 3	n. d.	-	+	(2), hier
107	S	A	Schleife β 2 β 3	n. d.	+	+	(2), hier
		R	Schleife β 2 β 3	-	n. d.	-	(3), hier
108	T	A	Schleife β 2 β 3	n. d.	+	+	(2), hier
109	R	A	Schleife β 2 β 3	n. d.	-	+	(2), hier
112	R	E		+	n. d.	+	(3), hier
119-122	TVQK	AAAA	Schleife β 3 β 4	n. d.	+	+	(2), hier
132-135	SSGL	AAAA	Schleife β 4 β 5	n. d.	+	+	(2), hier
135	L	R	Schleife β 4 β 5	-	n. d.	-	(3)
137	D	A	Ca ²⁺ coord.	-	-	+	(2), hier
	D	R	Ca ²⁺ coord.	-	n. d.	+	hier
	D	S	Ca ²⁺ coord.	-	n. d.	+	(3)
154-157	VGTD	AAAA	Schleife β 6 β 7	n. d.	-	+	(2), hier
155-156	GT	VA	nahe der Ca-Stelle	-	n. d.	+	hier
156	T	A	Schleife β 6 β 7	n. d.	+	+	(2), hier
157	D	A	Schleife β 6 β 7	n. d.	+	+	(2), hier
158	D	A	Schleife β 6 β 7	n. d.	+	+	(2), hier
167-170	IIND	AAAA	Schleife β 7 β 8	n. d.	+	+	(2), hier
179	T	A		+	n. d.	+	(3)
184	N	A	Schleife β 8 β 9	n. d.	+	+	(2), hier
190-193	DSWP	AAAA	Schleife β 9 β 10	n. d.	+	+	(2), hier
232-235	RQLT	AAAA	Schleife β 10 β 11	n. d.	-	+	(2), hier
232	R	A	Schleife β 10 β 11	n. d.	+	+	(2), hier
233	Q	A	Schleife β 10 β 11	n. d.	+	+	(2), hier
234, 236, 238	L, I, N	SSD	Laminin 2 α -ähnl. Ca ²⁺ coord.	-	n. d.	-	hier
235	T	A	Sulfat-bindung	+	+	+	(2), hier
236	I	R	Nrnx/Nlgn Kontakt	-	n. d.	-	(3)
238	N	A	Ca ²⁺ coord.	-	-	+	(2), hier
	N	G	α LNS2-like Ca ²⁺ coord.	+	n. d.	+	hier
	N	R	Ca ²⁺ coord.	-, (+)	n. d.	-	(3), here
248-252	KEQGQ	AAAA	Schleife β 11 β 12	n. d.	+	+	(2), hier

1. Kang et al., 2008; 2. Graf et al., 2006; 3. Chen et al., 2008.

Tabelle 3-2. Übersicht der Mutationen in Neuroligin 1. Der Einfluß der Mutation auf den Nrnx/Nlgn Komplex wurde durch drei Methoden bestimmt: (i) Neurexinbindung (+) oder Nicht-Bindung (-) aus biochemischer Sicht; (ii) Synapsenbildung in Zellkultur hauptsächlich nachgewiesen durch Synapsin-Clusterbildung; und (iii) Berechnung der freien Energie (ΔG) durch das Programm FoldX auf Basis von Kristallstrukturen (Chen et al., 2008) mit negativen ΔG Werten, die eine Bindung (+) und positiven Werten, die eine Nicht-Bindung (-) kennzeichnen. Sequenznummerierung folgt dem SWISSPROT Eintrag NLGN1_RAT; die Regionen sind entsprechend der Nlgn 1 Struktur bezeichnet (Abb. 3-13); n.d. = nicht detektiert.

Position	Aminosäure	Mutation	Region/ Funktion	Neurexin- bindung	Synapsen- bildung	FoldX	Referenz
Neuroligin 1							
100	P	S	Zn Stelle in AChE	+	n. d.	+	hier
111	T	A		+	+	+	(4)
118-149	PQN...QDQ	YQY...REL	FasclI Stelle in AChE	+	-	+	(5)
192	P	A		+	n. d.	+	hier
266	G	D		+	n. d.	+	hier
266	G266L273	DD		+	n. d.	+	hier
271	D	R		-	n. d.	+	hier
273	L	E		+	n. d.	+	hier
273	L	G		+	n. d.	+	hier
286	C	A	Dimerkontakt	n. d.	n. d.	+	(6)
294	H	V		+	n. d.	+	hier
297-306	EGNRWSNSTK	AA		+	n. d.	+	(7)
298-306	GNRWSNSTK	deletion	B Insertion	+	n. d.	+	hier, (3)
298-305	GNRWSNST	deletion		+	+	+	(7, 8)
303	N	A	N-glyko Stelle	+	+	+	(4)
303	N	D	N-glyko Stelle	+	n. d.	+	(7)
343-348	NVSDTV	PPG...NDT		+	+	+	(5)
343	N	A	N-glyko Stelle	+	n. d.	+	(4)
397	E	A		-	n. d.	+	(3), hier
399	L	S		+	n. d.	+	hier
399, 400, 402	LND	AAN	Nrx/Nlgn Kontakt	-	n. d.	+	(9)
399, 400, 402, 395, 397	LNDQE	AANAA	Nrx/Nlgn Kontakt	-	n. d.	+	(9)
399, 400, 402, 297, 306	LNDEK	AANAA	Nrx/Nlgn Kontakt	-	n. d.	+	(9)
400	N	A		-	n. d.	+	(3), hier
421-433	DSD...FDF	deletion	put. EF1 hand Motiv R451C in hum. Nlgn3	+	n. d.	+	hier
473	R	C		+	+	+	(5), (6)
473	R	T		+	n. d.	+	(6)
473	R	E		+	n. d.	+	(6)
500	G	A	Gln in Nlgn2	-	n. d.	+	(10)
535-546	IPM...FPC	LPLDPSL		n. d.	-	+	(5)
549	S	A	O-glyko Stelle	+	n. d.	+	(4)
557-558	AV	DR		+	n. d.	+	hier
574-591	QPV...RFE	DPRDSK	Nlgn spez. Schleife L34	+	+	+	(5)
576-590	VPQ...NRF	deletion	Nlgn spez. Schleife L34	+	n. d.	+	hier
617-618	HY	AA	Dimerkontakt	n. d.	+	+	(11)
619, 621	RN	AA	Dimerkontakt	n. d.	+	+	(11)
622-623	KV	AA	Dimerkontakt	+	-	+	(11)
624-625	NL	AA	Dimerkontakt	n. d.	+	+	(11)
626-627	WL	AA	Dimerkontakt	n. d.	+	+	(11)
628-629	EL	AA	Dimerkontakt	+	-	+	(11)
639-843		deletion	lösliche AChE-ähnliche Domäne	+	n. d.	+	(4)

3. Chen et al., 2008; 4. Comoletti et al., 2003; 5. Chubykin et al., 2005; 6. Comoletti et al., 2004; 7. Comoletti et al., 2006; 8. Boucard et al., 2005; 9. Arac et al., 2007; 10. Fabricnhy et al., 2007; 11. Dean et al., 2003.

als 1 kcal/mol erzeugen. Dass L399 nur einen schwachen Einfluss auf die Komplexbildung haben kann, wird durch die L399S Mutation gezeigt, die unverändert Neurexin bindet (Fig. 3-11, Bahn 9), während die experimentellen Daten zur Bindungsunfähigkeit von G500A noch nicht gezeigt wurden (Fabrichny et al., 2007). Zusammenfassend wird der Neurexin/Neurologin-Komplex in der Art klassifiziert, dass die Kontaktstelle im wesentlichen durch sich wechselseitig stabilisierende hydrophobe Reste gebildet wird, während die Calciumbindung im Zwischenraum der Kontaktstelle einen eigenen unabhängigen energetischen Anteil liefert, der hauptsächlich durch die Neurexinreste β D137 und β N238 getragen wird. Die auf Neurexin identifizierten *hot spot* Reste befinden sich auf einer rigiden Kernstruktur und werden für alle Neurologin Isoformen (Neurologin 1-4) unabhängig von *splice*-Insertionen benötigt. Demgegenüber ist die Neurexinkontaktstelle auf Neurologin strukturell "weicher", da kontaktierende Seitenketten wie H294 und L399 ohne Bindungsverlust mutiert werden können (Abb. 3-11C) und Neurologin die an Neurexin gebundenen Calciumionen ausschliesslich über Wasserbrücken bindet (Chen et al., 2008). Stabilisiert wird der Komplex über eine die Calciumkoordination umschließende hydrophobe Sphäre. Diese Form einer Calciumbindungsstelle ist neu und für den Neurexin/Neurologin Komplex essentiell erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Strukturmodellierung und gezielte Mutagenesestudien gezeigt, dass Neurexin an Neurologin 1, 2 und 3 mit derselben Kontaktregion bindet (Abb. 3-9D) wie sie auch in den Kristallstrukturen von 1β LNS mit Neurologin 1 und 4 gefunden wurde. Interessanterweise können die Kristallstrukturen nicht als Vorlage für den Neurexin/Neurologin 2 Komplex dienen, da in Neurologin 2 an Stelle des *hot spots* G500 ein Glutamin vorkommt, welcher den Komplex destabilisiert (Tabelle A 8-3) und bereits die Mutation Neurologin 1 G500A Neurexin nicht mehr band (Fabrichny et al., 2007). Hiernach gibt es für alle Neurologinisoformen eine einzelne fein konturierte Bindungsregion auf Neurexin, aber eine modifizierte oder gänzlich andere Kontaktregion für Neurexin auf Neurologin 2.

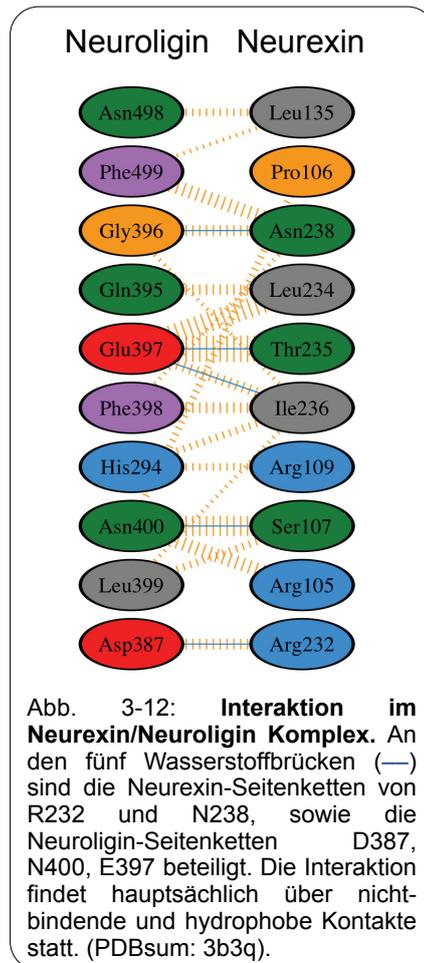
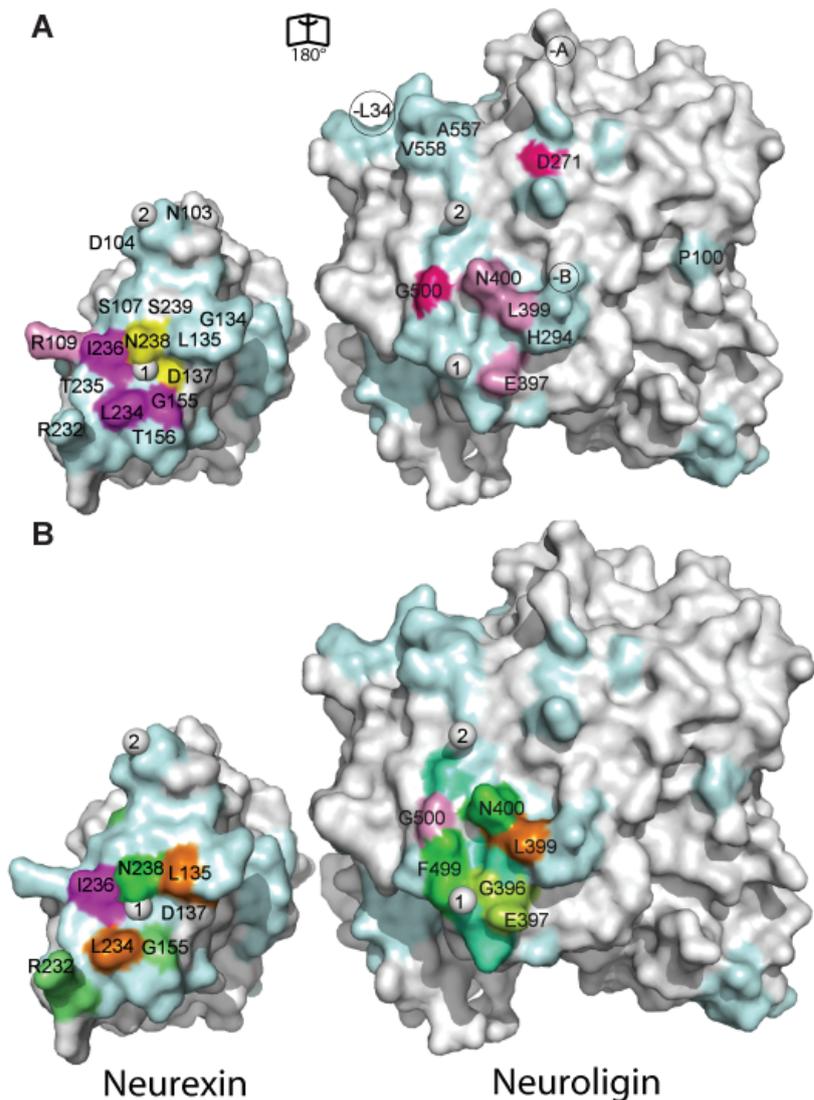


Abb. 3-13. **Zusammenfassung der strukturellen Eigenschaften der Neurexin/Neurologin Kontaktstelle.** (A) Experimentell bestimmte *hot spot* Reste des Neurexin/Neurologin Komplexes. Neurologin bindet an eine fein konturierte Reihe von hydrophoben Seitenketten der Reste β G155, β L234, β I236 und β R109 (magenta), welche die Calciumkoordinationsstelle umgeben (gelb). Alle restlichen Reste auf dieser Oberflächenregion haben keinen Effekt auf die Neurologinbindung in Mutageneseexperimenten gezeigt (cyan). Auf der Oberfläche der AChE-ähnlichen Domäne von Neurologin wurde in dieser Arbeit D271 als essentiell erforderlich für die Neurexinbindung identifiziert. D271 ist in der Nähe der *splice*-Insertionen A und B, sowie der Neurologin-spezifischen Schleife L34 (als Kreise markiert), welche alle drei die Neurexinbindung verstärken, wenn sie deletiert sind. Nur G500A kann als Einzelmutteration ebenfalls die Komplexbildung unterbinden (Fabrichny et al. 2007), während L399 und N400 (in pink) nur in der Dreifachmutation Nlgn1-LND Neurexin nicht binden (Arac et al, 2007). (B) Prognose des Verlustes an freier Bindungsenergie durch Alaninmutationen am Neurexin/Neurologin Komplexes (PDB: 3b3q). Drei Neurexinreste wurden als *hot spots* identifiziert: I236 ($\Delta\Delta G = 2$ kcal/mol, magenta), L234 und L135 ($\Delta\Delta G = 1$ kcal/mol, orange), während der Interaktionsverlust durch R232A und N238A Mutationen die Komplexstabilität nur um 20% und 30% gegenüber I236A (100%) reduziert. Auf der anderen Seite werden zwei Neurologinreste als *hot spots* hervorgehoben: G500 (pink) und L399 (orange). Die Reste F499 und N400 (beide in grün) haben einen mittleren Effekt ($\Delta\Delta G = 0,9$ kcal/mol), während von den Resten in der Nähe der Calciumbindungsstelle (Nummer 1), G396 und E397 (beide in hellgrün) die Stabilität nur minimal um 0,4 kcal/mol erniedrigen. Die berechneten $\Delta\Delta G$ Werte der Alaninmutationen sind in Regenbogenfarben von 0 (cyan) bis 2 kcal/mol (magenta) kodiert. Die Neurexin/Neurologin Kontaktfläche wurde um 180° geöffnet und die zwei Calciumionen (als Kugeln), welche an die isolierte β LNS binden (Abb. N3D) wurden mit 1 und 2 nummeriert. Auf der Neurologinoberfläche wurden die Calciumionen zur besseren Orientierung ebenfalls dargestellt, obgleich Neurologin nicht direkt, sondern nur über Wasserbrücken an Calcium bindet.



4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Calciumbindung auf synaptische Proteine durch bioinformatische und experimentelle Methoden untersucht. Vor Beginn eines jeden experimentellen Zyklus wurden die bereits vorhandenen funktionellen Daten mit Hilfe von Proteinstrukturmodellen verglichen (Abb. 1-4). Für die Modellierung und bioinformatische Analyse wurden öffentlich zugängliche WWW-Dienste eingesetzt und zu Arbeitsabläufen kombiniert (Abb. 1-5). Von einigen Modellstrukturen wurden später NMR- oder Kristallstrukturen publiziert, die eine kritische Betrachtung auf Richtigkeit und Qualität der Modelle und Methoden erlaubten und hier diskutiert werden sollen. So wurde ein Konformationsraummodell entworfen, welches die Struktur von EF Hand Proteinen in fünf Kernstrukturen (Subdomänen) einteilte (Abb. 3-1) und sterische Blockaden bei Konformationsänderungen aufdeckte (Abb. 3-2). In weiteren Analysen zeigte sich, dass Neuroligin nur entfernt einem EF Hand Protein ähnelt (Abb. 3-4). Die Bindung an Neurexin erfolgt demgemäß nicht in der Art von EF Hand Proteinen, sondern unter Ausbildung eines neuartigen Komplexes, in dem ein Calciumion in einer hydrophoben Umgebung in mitten der Protein-Proteinkontaktstelle eingeschlossen wird. Die an der Komplexbildung beteiligten Reste von Neurexin wurden allein auf Basis von Modellstrukturen (Abb. 3-5) und davon abgeleiteten gezielten Mutagenesen bestimmt (Abb. 3-6 bis 3-9). Kürzlich gelöste Kristallstrukturen bestätigten die Neuroliginmodellstruktur (Abb. 3-10) und die Bindungsexperimente mit gezielt mutierten Neuroliginen (Abb. 3-11). Abschliessend konnten *hot spots* an der Kontaktstelle des Neurexin/Neuroligin Komplexes bestimmt werden (Abb. 3-13), die zeigten, dass hydrophobe Wechselwirkungen für die hoch-spezifische Bindung von Neurexin an Neuroligin verantwortlich sind.

4.1 Methodenentwicklung

4.1.1 Grenzen der Modellierung

Die Identifikation von rigiden Kernstrukturen und daran anschließend die oft neue Definition von strukturellen Domänen und Subdomänen war eine unerlässliche Voraussetzung für die vorgestellten Methoden zur Proteinstrukturmodellierung. Die Kernregionen von Domänen haben qualitativ hochwertige Modelle bilden lassen, während die zugehörigen Schleifenregionen schon in der Referenzstruktur flexibel waren oder fehlten und infolgedessen keine bestimmte Faltung modelliert werden brauchte. Um so überraschender war es, wenn später erschienene Kristallstrukturen eine rigide Konformation für eine Schleife zeigten wie sie für die Omega-Schleife (As. 122-146) im Neurexin/Neuroligin Komplex gefunden wurde. Diese reicht tief in das inaktive Zentrum der CAM Domäne von Neuroligin hinein (Chen et al., 2008). Es gibt nur eine Konformation der Schleife innerhalb der Bindungstasche und die Schleife scheint während der Domänenfaltung im ER dort hineingebracht worden zu sein, da es mit dem *normal-mode*-Verfahren eNémo (Suhre et al., 2004) nicht möglich war, diese Schleife im reifen

Protein ohne Deformation der restlichen Struktur wieder zu exponieren (Daten nicht gezeigt). In vergleichbarer Weise wurde mit der Kristallstruktur von PSD95 eine Beta-Beta-Wechselwirkung des flexiblen C-Terminus der GuK mit der SH3 Domäne identifiziert (Tavares et al., 2001), die keiner der vorab publizierten Lösungen nach einem *Docking* mit dem Programm FTDock entsprach (Wu et al., 2000). Diese genannten Wechselwirkungen sind zu kompakt gebaut als dass sie mittels *Docking*-Verfahren modelliert werden könnten. Bei diesen Verfahren wird der Hydratationsradius für jedes an der Oberfläche befindliche Atom auf 4Å festgesetzt, wodurch tiefe Bindungstaschen zu eng und flexible Schleifen zu voluminös werden als dass sie zueinander passen könnten. Es ist technisch möglich auch solche Interaktionen zu modellieren, doch macht dies nur Sinn, wenn hierzu experimentelle Indizien vorliegen, da sowohl der Rechenaufwand als auch die Fehlerquote mit abnehmenden Hydratationsradius steigt. Die *Docking*-Verfahren RosettaDock, ZDOCK und 3DGarden haben hingegen in der Re-Analyse des Neurexin/Neurologin Komplexes (pdb: 3b3q) die kristallisierte Kontaktstelle finden können, wenn auch in unterschiedlichen Rangordnungen zwischen Platz 4 und 50 (Tabelle 8-1, Abb. 8-1). RosettaDock hatte als einzige Methode auch die richtige Orientierung auf Platz 5 gefunden. Allerdings suchte RosettaDock nur im Umkreis von 20Å um den eingesandten initialen Komplex, der hier die unveränderten Originalkoordinaten der Struktur 3b3q enthielt. Somit eignet sich RosettaDock um manuell platzierte Protein-Protein Komplexe optimieren zu lassen und insbesondere 3D Garden für die Vorauswahl von potentiellen Kontaktstellen.

4.1.2 Modellierung des Konformationsraums

Mit Hilfe des vorgestellten Konformationsraummodells mit unabhängig voneinander sich bewegenden Subdomänen kann für eine neue Proteinsequenz jede mögliche Konformation virtuell erprobt werden. Das Konformationsraummodell erweitert die als *cross-* und *hybrid-modeling* bekannten Methoden in der Art, dass nicht wie bei einer vergleichenden Analyse von EF Hand Proteinen die Zwei-Domänen Einteilung festgesetzt und nur die CaM Sequenz auf die Recoverinstruktur und umgekehrt modelliert wird (Pawlowski et al., 1996), sondern dass die Subdomänen relativ objektiv über C α -C α Differenzabstandsgraphen als rigide Kernstrukturen bestimmt und über Permutationen neue hybride Konformationen erhalten werden können. So gelang es am Beispiel des *Myristoyl-Switch* von Vilip-1 (Abb. 3-2) eine Übergangsstruktur zu modellieren, die später durch eine Kristallstruktur bestätigt wurde (Ames et al., 2002) und eine große Überraschung darstellte, da sie in der Animation des Myristoyl-Switch nicht vorkam (Ames et al., 1997). Bei dieser Animation wie auch bei neueren Elastischen-Normal-Mode Verfahren eINémo werden alle Atome gleichzeitig von ihren Anfangs- zu ihren Zielkoordinaten bewegt. Beim *Myristoyl-Switch* wurde dadurch die NSd wegbewegt, während sich die Myristoylgruppe und die *core2/Csd* näherte, so dass es keine Intermediärstruktur gab in der die Myristoyl-gebundene NSd auf ihrer End- und die *core2/Csd* noch an ihrer Anfangsposition war.

Wie sich bei der Strukturanalyse der EF Hand Proteine herausgestellt hat (Abb. 3-1), sind deren paarweise gekoppelten calciumbindenden Schleifen keine rigide Struktureinheit wie

es die Domänklassifikation EFh (SMART Eintrag: SM00054) oder die Rekonstruktionserfolge von einzelnen EF Hand Schleifen (*split*-EFhands, (Shuman et al., 2006)) suggerieren. Der Terminus Scharnier (*hinge*) beschreibt die Funktion der EF Hand treffender. Es sind die sie umgebenden Regionen, welche rigide Subdomänen darstellen (Abb. 3-1) und innerhalb der Proteinfamilie verschiedene Positionen im Raum einnehmen können. Die mit 1Å sehr hoch aufgelöste Calmodulinstruktur (Wilson und Brunger, 2000) zeigte, dass sich diese Subdomäneneinteilung bereits in der substrat-freien Einzelstruktur abzeichnet, dennoch wurden EF Hand Proteine weiterhin nur in zwei Domänen eingeteilt (Grabarek, 2006). Die Peptidbindungsstelle in CaM und die Myristoylbindungsstelle in NCS Proteinen sind kongruent auf der *core*-Subdomäne (Abb. 3-1) und diese *core*-Subdomänen erlauben nun einen direkten Vergleich von Bindungsstellen innerhalb der gesamten EF Hand Proteinfamilie.

4.1.3 Planung von gezielten Mutagenesen

Das vorab erstellte Gesamtproteinmodell und die Konformationsraumanalyse machten es möglich, dass nur mit wenigen einzelnen Mutationen Funktionen von Proteinen ausgeschaltet oder neue Funktionen eingefügt werden konnten. So wurden die Bindungsstellen von Caldendrin an Jacob (Dieterich et al., 2008), LC3 (Seidenbecher et al., 2004) oder SAP97 (Strumpf et al., 2003 und Daten nicht gezeigt), wie auch die Neuroliginbindungsstelle auf Neurexin bestimmt. In Neurexin erlaubte die rigide *core*-Struktur der LNS Domänen (Abb. 3-5A) den Funktionstransfer der Calciumbindungsstelle von der Neurexin 1 α LNS2, bzw. der von Laminin 2 α LNS5 auf die Neurexin 1 α LNS6 (Abb. 3-8 und 3-9). Hierdurch war es möglich die hydrophobe Kontaktstelle von Neuroligin auf der 1 α LNS6/1 β LNS Domäne genau zu kartieren (Abb. 3-13), was durch einen die ganze Oberfläche abdeckenden experimentellen Alanin-Scan (Graf et al., 2006) oder durch den Einsatz sterisch den Kontakt blockierenden Mutationen wie β L236R und β S107R nicht erreicht wurde (Chen et al., 2008). Mutationen zu großen Seitenketten waren hingegen geeignet, hier die Modellkomplexe oder von Chen et al. die Kristallstruktur zu bestätigen (Abb. 3-9 und Chen et al., 2008). Die funktionelle Analyse nach gezielten Mutationsexperimenten wird nach den hier gemachten Erfahrungen erleichtert, wenn die Mutationen (i) funktionelle Epitope anderer Proteinfamilien generieren oder (ii) Modellstrukturen bestätigen können. Erst nach diesen Voranalysen ist es effizient, einen experimentellen Alanin-Scan für die Kartierung der *hot spot* Grenzen im Modellkomplex einzusetzen.

Die Analysen haben zudem ergeben, dass eine Mutation zu Glycin nicht unweigerlich eine höhere Flexibilität in die Proteinfaltung induziert und eine durch einen Alanin-Scan als essentiell markierte Seitenkette funktionell ersetzen kann. So waren die Calciumbindungsstellen der 1 α LNS2 und 1 α LNS6 identisch gefaltet (Abb. 3-5, Sheckler et al., 2006; Rudenko et al., 1999) und hat eine β N238G Mutation keinen Funktionsverlust (Abb. 3-8) wie die entsprechende Alaninmutation gezeigt (Abb. 3-6).

4.2 Neurexin/Neuroligin Komplex

In dieser Arbeit wurden die Kontaktstellen auf der Neurexin- und Neuroliginoberfläche durch

die Anwendung von Strukturmodellierung, gezielten Mutagenesen und Bindungsstudien identifiziert (Abb. 3-3 bis 3-11). Die kürzlich publizierte Kristall- und NMR-Strukturen von Neurexin/Neurologin Komplexen verschiedener Spezies und Isoformen (Arac et al., 2007; Chen et al., 2008; Fabrichny et al., 2007), wie auch die isolierten Strukturen von Neurexin LNS (Shen et al., 2008; Koehnke et al., 2008) und Neurologin CAM Domänen (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007) haben die Modellstrukturen (Abb. 3-10) und die Kontaktstelle (Abb. 3-13) bestätigt. Auf Basis der neuen Strukturdaten konnten die experimentellen Mutationsdaten (Tabellen 3-1 und 3-2) überprüft und deren Anteil an der Komplexstabilität berechnet werden (Tabellen 8-2 und 8-3). Die Kontaktstellen wurden dadurch feingenu kartiert und essentielle *hot spots* auf Seiten von Neurexin und Neurologin bestimmt (Abb. 3-13). Zusätzlich wurde hier mit D271R eine Neurologinmutation experimentell identifiziert, die eine Komplexbildung verhindert aber nicht direkt an der Kontaktbindungsstelle beteiligt ist.

4.2.1 Agrin, Laminin, und Neurexin bilden eine Untergruppe der LamG/LNS Familie

Die Lektin-ähnlichen Domänen, zu denen auch die LNS gehören, bilden eine der größeren Faltungsfamilien in der ECM (Hohenester und Engel, 2002). Welche Funktionen diese Domänfamilie in der ECM besitzen ist noch weitestgehend ungeklärt. Von vielen ist bekannt, dass sie der Bindung von Glykanen und Glykoproteinen dienen, obgleich es keine konservierte Bindungsstelle zu geben scheint und eine grobe Kartierung von Bindungsepitopen für Zuckerketten bisher nur experimentell möglich war (Hohenester et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LNS Domänen von Agrin, Laminin und Neurexin nahezu identisch gefaltet sind ($r.m.s.d < 1.3\text{\AA}$), deren Calciumbindungsstelle konserviert ist und deren Domäne eigentlich LNA heißen müsste, da das namensgebende SHBG an anderer Stelle Calcium koordiniert. Deren elektrostatischen Oberflächenpotentiale weisen hingegen nur wenige Gemeinsamkeiten auf (Abb. 3-5), während alle drei Proteine mit einigen ihrer LNS Domänen calciumabhängig an die Zuckerketten von α -Dystroglycan binden (Hohenester et al., 1999; Sugita et al., 2001; Stetefeld et al., 2004). Die für Laminin in der nahen Umgebung der Calciumbindungsstelle bestimmte Bindungsregion für α -Dystroglycan ist in Agrin oder Neurexinen nicht konserviert (Daten nicht gezeigt). Das wirft neue Fragen in Bezug der wechselseitigen Bindung von α -Dystroglycan und Neurologinen an die LNS Domänen von Neurexinen auf.

4.2.2 Calciumkoordination

Die Calciumbindung im Neurexin/Neurologin Komplex als auch dessen Wirkung auf den transsynaptischen *splice*-Code konnte hier experimentell ermittelt werden (Abb. 3-3 bis 3-6). So haben Strukturvergleiche der modellierten CAM Domäne von Neurologin mit EF Hand Domänen, sowie die erfolgreiche Bindung von Neurexin an Neurologin, dessen EF Hand 1 deletiert war, gezeigt, dass Neurologin eine degenerierte EF Hand besitzt und diese nicht für die Interaktion mit Neurexin benötigt (Abb. 3-4). Nach einem weiteren Strukturvergleich von calciumbindenden LNS Domänen mit denen von Neurexin wurden erste Hinweise erhalten, dass Calcium entgegen der bisherigen Annahme (Nguyen et al., 1997) an Neurexin binden könnte (Abb. 3-5). Der Nachweis gelang als Alanin- oder Argininmutationen

calciumkoordinierender Reste in Neurexin zum vollständigen Verlust der Neurexin/Neurologin Komplexbildung führten (Abb. 3-6) und erstmals auch die Bindung von Calcium-45 an isolierte α LNS6 und β LNS Domänen gezeigt werden konnte (Abb. 3-9). Die 2.4Å aufgelöste Komplexstruktur hat bestätigt, dass Calcium wie im Modell (Abb. 3-5) ausschliesslich von Resten auf Neurexin koordiniert wird (D137, V154, I236, N238 in β -Neurexin) und Neurologin nur über Wasserbrücken an Calcium bindet, während die Bindung von Calcium an die isolierte 1β LNS Domäne aufgrund fehlender exothermer Reaktion in Isothermen Calorimetrie (ITC) Experimenten weiterhin bestritten wurde (Chen et al., 2008). Erst weitere ITC Experimente und die calciumgebundene 1β LNS Domäne mit und ohne *splice*-Insertion SS4 (Shen et al., 2008) bestätigten die hier gezeigte Calcium-45 Bindung. Durch eine Mutation β N238G konnte die Calciumkoordination der α LNS2 (Abb. 3-5) auf die α LNS6 (Daten nicht gezeigt) und β LNS transferiert werden. Während β N238A die Komplexbildung komplett unterband (Abb. 3-6), hat β N238G Neurologin gebunden und die Calciumaffinität des Komplex um das 200-fache gesenkt (Abb. 3-8). Dass sich der Neurexin/Neurologin Komplexes auch mit niedrigster Calciumaffinität noch bei einer physiologischen Calciumkonzentration von 2mM bildet, macht es nicht wahrscheinlich, dass Änderungen in der Calciumaffinität die Spezifität des *splice*-Codes (Boucard et al., 2005) determinieren wie es vorgeschlagen wurde (Sheckler et al., 2006; Arac et al., 2007; Chen et al., 2008; Shen et al., 2008; Koehnke et al., 2008b). Dem widerspricht auch, dass die isolierte 1β LNS Domäne mit SS4 eine höhere Calciumaffinität aufwies (Shen et al., 2008), während die Komplexbildung mit den Neurologin Isoformen 1-3 mit SS4 eine um ca. 50% geringere Ausbeute liefert (Abb. 3-6C, 3-7C und (Comoletti et al., 2003; Koehnke et al., 2008b)) und eine 10-fach höhere Calciumkonzentration benötigt (Abb. 3-7A,B). Die kürzlich gelösten Kristallstrukturen und NMR Daten konnten bereits zeigen, dass sich SS4 im Gleichgewicht von mindestens zwei Konformationen befindet (Shen et al., 2008; Koehnke et al., 2008b). Die Insertion von SS4 (As. 200-230 in 1β LNS) hat die Positionen der oben genannten calciumkoordinierenden Reste nicht verändert, sondern das benachbarte Q233 derart orientiert, dass dessen Carbonylsauerstoff zusätzlich Calcium ligierte, was auch die erhöhte Calciumaffinität erklärte. Gleichzeitig blockierte SS4 aber eine Bindung an Neurologin (Shen et al., 2008). Für die Komplexbildung löste sich die SS4 Konformation zu einer flexiblen Schleife auf (Koehnke et al., 2008b). Scheinbar produziert SS4 im Komplex einen sterischen Stress auf die Calciumkoordinierenden Reste, so dass die Calciumaffinität moderat gesenkt wird (Abb. 3-8A, B). Calcium wirkt nach diesen Ergebnissen in gegensätzlicher zweifacher Form, indem es (i) für die Bindung von Neurexin und Neurologin essentiell benötigt wird, aber gleichzeitig (ii) die Neurexine mit SS4 in der inaktiven Form stabilisiert.

4.2.3 Der Transsynaptische Code

Die *splice*-Insertion SS4 scheint in einem ausgeglichenen reversiblen Gleichgewicht zu stehen, da *surface-plasmon-resonance*-Experimente jeweils eine 50%ig niedrigere Bindungskapazität für Neurexine mit SS4 gezeigt haben, die unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration war (Comoletti et al., 2003; Koehnke et al., 2008b). Demgegenüber ist die Komplexbildung nahezu irreversibel und nach mehrstündigen Inkubationszeiten in *pull-down*- oder *live cell labeling*-Experimenten werden höhere bis vollständige Ausbeuten auch für Komplexe mit allen *splice*-Insertionen erhalten (Daten nicht gezeigt und Boucard et al., 2005). Der gebildete Komplex ist sehr stabil und kann erst nach längerer Einwirkung mit hohen Salzkonzentrationen und Calcium-Chelatoren (z.B. EDTA) wieder aufgelöst werden (Comoletti et al., 2003). Der Transsynaptischen Code stellt hiernach kein absolutes Bindungsmuster dar, bei dem bestimmte Kombinationen von *splice*-Insertionen zu einem kompletten Bindungsverlust führen wie es die Mutationen an den essentiellen Resten gezeigt haben (Abb. 3-6 bis 3-9). Er ist vielmehr ein Zeit-Code, der die Bildung von Komplexen ohne *splice*-Insertionen schneller (ohne Behinderung) ablaufen lässt (Abb. 4-1A, C), während Neurexine mit SS4 erst eine langsame Konformationsänderung von SS4 durchlaufen müssen (Abb. 4-1B, D), die zudem durch Calcium stabilisiert wird (Shen et al., 2008). Vom ursprünglichen *splice*-Code (s. Einleitung, Tabelle 1-1) ist nur die fehlende Interaktion der Gesamtstruktur von α -Neurexin mit SS4 und Neuroligin+B erhalten (Abb. 4-1D, untere Reihe). Die zeitverzögerte Bindung von *splice*-Insert tragenden Neurexinen kann die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse aus vorherigen Publikationen erklären. Hier wurden alle *pull-down*-Experimente unter gleichen Bedingungen und im *Batch*-Verfahren mit einer Inkubationszeit

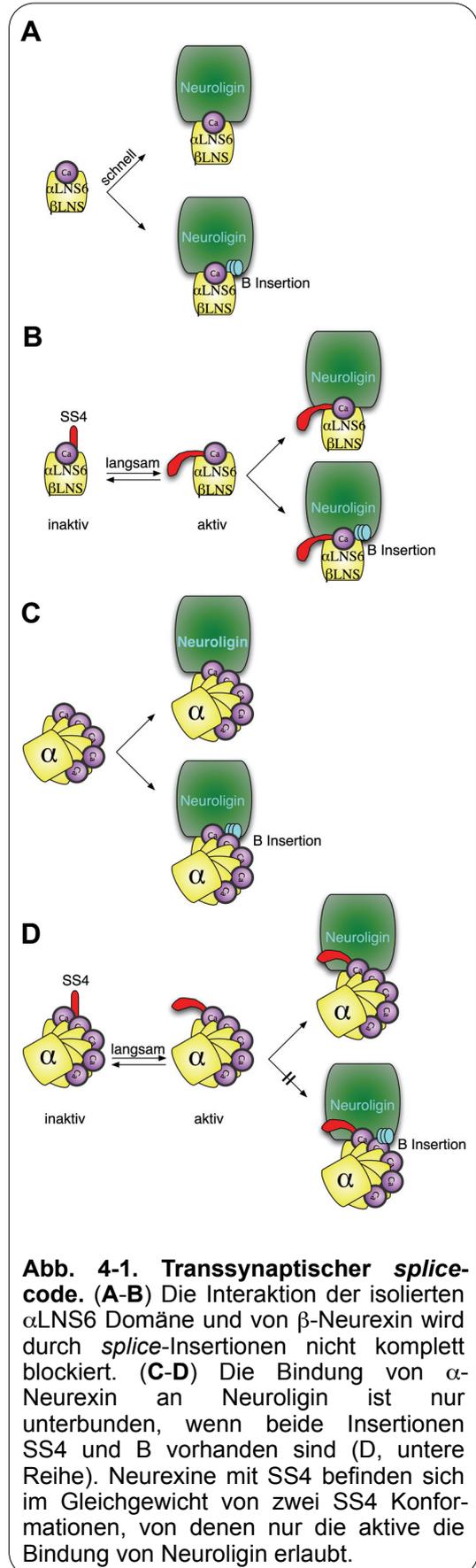


Abb. 4-1. Transsynaptischer *splice*-code. (A-B) Die Interaktion der isolierten α LNS6 Domäne und von β -Neurexin wird durch *splice*-Insertionen nicht komplett blockiert. (C-D) Die Bindung von α -Neurexin an Neuroligin ist nur unterbunden, wenn beide Insertionen SS4 und B vorhanden sind (D, untere Reihe). Neurexine mit SS4 befinden sich im Gleichgewicht von zwei SS4 Konformationen, von denen nur die aktive die Bindung von Neuroligin erlaubt.

von 2 Stunden durchgeführt, während in den SPR- oder Säulenchromatographischen Verfahren anderer Studien die Verweilzeiten für die Interaktionspartner im Minutenbereich lagen (Nguyen et al., 1997; Boucard et al., 2005; Shen et al., 2008; Koehnke et al., 2008b). Hierdurch und durch die zusätzlichen Wasch- und Elutionsschritte (Nguyen et al., 1997; Boucard et al., 2005) könnte die Menge der *splice*-Insert tragenden Komplexe unterhalb der jeweilig gewählten Detektionsgrenze gelegen haben.

Intensitätsmessungen nach *live-cell-labeling* Experimenten in Zellkultur haben dem Neurexin Rest β T235 ebenfalls eine *splice*-Code Funktion zugeschrieben (Graf et al., 2006, Shen et al., 2008). Die hier durchgeführten *pull-down*-Experimente mit der Mutation β T235A konnten indes nicht bestätigen, dass β T235A die Neuroligin Isoformen 1-3 mit unterschiedlicher Ausbeute bindet (Abb. 3-6) und andere Faktoren als die *splice*-Insertionen den Code definieren.

4.2.4 Kontaktstelle im Neurexin/Neuroligin Komplex

Die Kristallstrukturen haben die gleiche Kontaktstelle in den Komplexen von β -Neurexin mit Neuroligin 1 (Arac et al., 2007; Chen et al., 2008) und 4 (Fabrichny et al., 2007) gezeigt, wobei nur die mit 2.4Å aufgelöste Neuroligin 1 Struktur die Positionen der Seitenketten, Calcium und Wassermoleküle eindeutig nachweisen konnte (Chen et al., 2008). Hiernach wird der Komplex durch (i) vier Seitenketten zu Hauptketten Wasserstoffbrücken (H-Brücken), (ii) zwei Salzbrücken und (iii) 19 nicht-bindende Interaktionen zusammengehalten (Abb. 3-12). Es werden eine H-Brücke von β -Neurexin (β N238 zu G396) und drei von Neuroligin (E397 zu β T235 und β I236; N400 zu β S107) gebildet. Dementsprechend haben die Alaninmutationen β S107A und β T235A der über Hauptketten interagierenden Reste keinen Einfluss auf die Komplexbildung (Abb. 3-6, Tabelle 3-1 und Graf et al., 2006). Aber auch keine Einzelmutation von Resten, die über Seitenketten Salz- (β R232/D387 und β R109/E297) oder H-Brücken (E297A, D387A, E397A, N400A) bilden, führten zu einem kompletten Bindungsverlust (Tabelle 3-1) wie es Mutationen an β D137 gezeigt haben (Abb. 3-6, Tabelle 3-1). β D137 dient ausschließlich der Calciumkoordination (Abb. 3-5) und geht keine weitere Wechselwirkung ein. Demgegenüber bindet β N238 an Calcium und G396 (Chen et al., 2008). Durch die β N238G konnte hier gezeigt werden, dass die Bindung an G396 nicht essentiell ist, während die Asparagin-oder Asparaginsäure-Seitenkette für eine hohe Calciumaffinität erforderlich ist (Abb. 3-8). Aufgrund seiner direkten Calciumbindung ist β N238 als *hot spot* deklariert worden (Abb. 3-13). Die Wechselwirkung von β R109 stellt sich ebenfalls sehr komplex dar. Die Kristallstrukturen zeigten hier die größten Divergenzen in Bindungsmodi und C α -Position (Arac et al., 2007; Chen et al., 2008), wobei in der 2.4Å aufgelöste Neuroligin 1 Struktur die Elektronendichte für dessen Seitenkette sogar gänzlich fehlte (Chen et al., 2008). Eine β R109A Mutation war synaptogenetisch inaktiv (Graf et al., 2006), zeigt hingegen keinen Bindungsverlust nach Δ G-Berechnungen auf Basis der Kristallstrukturen (Tabelle 8-3). Auch Einzelmutation der putativen Bindungspartner E297, H294 und L399 führten zu keiner (H294V und L399S in Abb. 3-11) oder nur zu einer moderaten Senkung der Komplexbildungsrate (E297A in (Comoletti et al., 2006)). Demnach ist β R109 für die

Ausbildung der Neuroligin-Bindungsstelle auf Neurexin erforderlich (Abb. 3-13), während die Kontaktstelle auf Neuroligin scheinbar von allen drei Bindungspartnern dynamisch gebildet werden kann (Chen et al., 2008). Im Ergebnis, sind es die 19 nicht-bindenden Interaktionen, die massgeblich an der Stabilität und Selektivität des Neurexin/Neuroligin Komplex verantwortlich sind. Die hier gezeigte Dreifachmutation β L234S+I236S+N238D hat allein die hydrophoben Wechselwirkungen entfernt

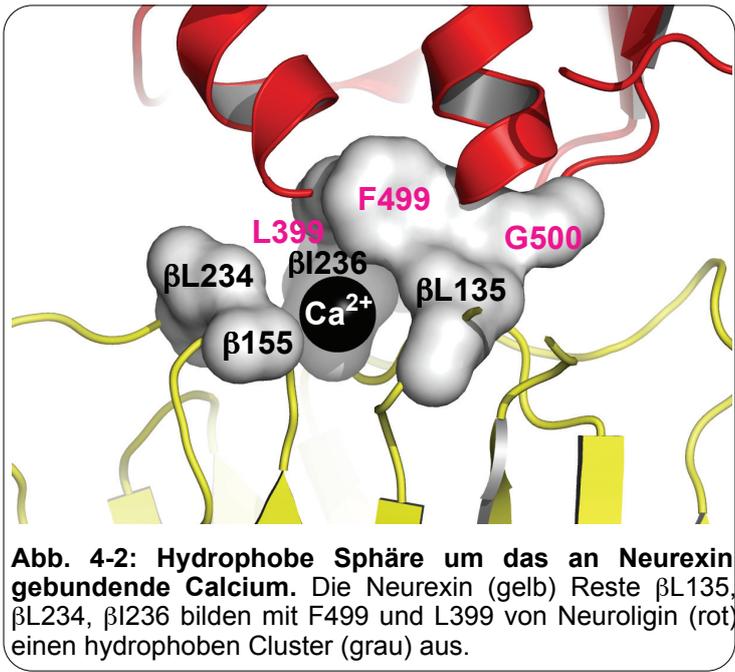


Abb. 4-2: Hydrophobe Sphäre um das an Neurexin gebundene Calcium. Die Neurexin (gelb) Reste β L135, β L234, β L236 bilden mit F499 und L399 von Neuroligin (rot) einen hydrophoben Cluster (grau) aus.

(Tabelle 8-2) und nicht durch die Einfuhr von großen Seitenketten wie bei β L135R, β L234R, β I236R, and N238R die Neuroliginbindung ausschliesslich durch eine sterische Wechselwirkungen komplett blockiert (vdW clash, Tabelle 8-2). Auf Seiten von Neurexin wird die *hot spot* Region der Kontaktstelle entweder von Resten gebildet, die Calcium koordinieren ((β D137, β N238), an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt sind (β G155, β L234, β I236) oder an beidem (β I236), während keiner eine polare Wechselwirkungen ausübender Rest essentiell erforderlich ist.

Der Neurexin/Neuroligin Komplex zeigt eine neue Bindungsgeometrie, bei der ein Calciumion im Sandwich von LNS und CAM Domäne durch einen hydrophoben Cluster umschlossen wird (Abb. 4-2). Scheinbar neutralisiert das zweifach positive Calciumion bei der Bindung an Neurexin dessen negativ geladene Bindungstasche (Abb. 3-5K) und verstärkt somit den Einfluss hydrophober Dipol-Dipol-Wechselwirkungskräfte. Die Restpartialladung des Calciumions kann durch die in der Kontaktstelle eingebundenen Wassermoleküle abgepuffert werden. Diese schwache Wechselwirkung des Metallions mit Neuroligin könnte dafür verantwortlich sein, dass Magnesium den Neurexin/Neuroligin Komplex nicht bilden lässt (Nguyen et al., 1997), obgleich die Bindung von Magnesium an eine isolierte LNS gezeigt werden konnte (Hohenester et al., 1999).

Zusätzlich konnte hier erstmals bestimmt werden, dass die *hot spot* Reste von Neurexin für die Bindung an die Neuroligin Isoformen 1-3 (Abb. 3-9) und wahrscheinlich auch an das an dieser Stelle strukturell identische Neuroligin 4 erforderlich sind.

Mutagenesestudien auf Seiten von Neuroligin schienen bisher schwieriger, da einige Mutationen zu einer Rückhaltung der Proteinprozessierung im ER führten, die entweder mit einer Fehlfaltung (Chubykin et al., 2005), dem Verlust der Dimerisierung (Dean et al., 2003) oder Chaperonbindung (Chubykin et al., 2005; Comoletti et al., 2004) erklärt werden konnten. Aus diesem Grund wurden hier alle Mutationen auf ihre Fähigkeit getestet, die Zelloberfläche zu erreichen (Abb. 3-11, Abb. 8-3, und Daten nicht gezeigt). Nur die Mutation D271 zu

Arginin führte hier zu einem kompletten Verlust der Neurexinbindung (Abb. 3-11, 3-13). Der Rest D271 liegt auf der Kernstruktur von Neuroligin (Abb. 3-10), die sich auch in Normal-Mode-Analysen als rigide Einheit bewegt (elNem Datenbank Einträge: ID 08073116215530468 (pdb: 3bix) und ID 0807311639402545 (3bix-D271R)) und ca. 12Å von der Neurexinbindungsstelle entfernt ist (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Chen et al., 2008). In einem möglichen Szenario initiiert das eingefügte Arginin an Position 271 eine Abstossungskettenreaktion von den ebenfalls auf der rigiden Kernstruktur verankerten R274 und R311, wodurch der Neurexinkontakt an der putativen zweiten Calciumbindungsstelle (Arac et al., 2007) blockiert werden könnte.

Nach einem Alanin-Scan auf der Neuroliginoberfläche auf Basis der Kristallstruktur (Chen et al., 2008) besitzt Neuroligin nur zwei *hot spots* (G500 und L399, Abb. 3-13, Tabelle 8-3). Da aber L399S die Komplexbildung nicht beeinflusst (Abb. 3-11, Tabelle 8-2), resultiert G500 als der wichtigste Rest im Komplex von Neurexin mit Neuroligin 1 und 4. Eine entsprechende Kontaktstelle auf Neuroligin 2 ist bis auf einen Austausch von G500 zu Glutamin identisch (Koehnke et al., 2008), welches zu lang ist, um in Analogie als G500Q Mutation in Neuroligin 1 eine Bindung an Neurexin zu ermöglichen. Bindet Neurexin in einer anderen Orientierung und einer anderen *hot spot* Region an Neuroligin 2, aber in etwa an die gleiche Bindungsstelle wie an Neuroligin 1, so müsste auch eine Mutation G500Q in der Lage sein, Neurexin zu binden. Alternativ kann es für Neurexin nur eine gänzlich andere Bindungsstelle geben, an der Neuroligin 2 spezifische Reste beteiligt sind. Zukünftige Experimente und Strukturanalysen werden zeigen, ob eine G500Q Mutation und Neuroligin 2 das an Neurexin gebundene Calcium direkt koordinieren können, etwas, was Neuroligin 1 nur über Wasserbrücken gelungen ist (Chen et al., 2008).

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinstrukturen und Protein-Protein Interaktionen mit leicht zu erlernenden Methoden erstellt. Zukünftig können diese Methoden verfeinert und die Verfahren weiter automatisiert werden. Schon jetzt gibt es mit 3D Garden oder dem Rosetta Server Online-Systeme zur Modellierung, die fast vollautomatisch ablaufen und somit als Referenz dienen können. Das Konformationsraummodell sollte als Standardmethode für jegliche Strukturmodellierung eingesetzt werden, da hierüber die Domänengrenzen exakt bestimmt und Barrieren in Konformationsbewegungen identifiziert werden können. Mit Hilfe dieses Verfahrens können die Komplexstrukturen von Caldendrin und MaGuKs modelliert und Mutagenesestudien durchgeführt werden. Desweiteren ist es nun möglich die Myristoyl- und Peptidbindungsstellen auf den *core*-Subdomänen von NCS Proteinen und Calmodulin-ähnlichen Proteinen direkt zu vergleichen und neue hybride Strukturen aus beiden Unterfamilien der EF Hand Proteine zu erstellen.

Die hier gezeigten Ergebnisse haben den transsynaptischen *splice*-Code näher spezifiziert. In weiteren Experimenten kann nun geprüft werden, welche strukturellen Faktoren in der Gesamtstruktur von α -Neurexin für die Erhaltung der inaktiven Konformation der α LNS6 verantwortlich sind. Die Kristallisation von α -Neurexin als Gesamtprotein ist aufgrund seiner Größe nicht wahrscheinlich. Von Laminin konnten bereits erfolgreich die LNS-Dimerstrukturen gelöst werden, die nun als Referenzstruktur für die Modellierung der LNS2-LNS3 und LNS4-LNS5 Dimere in α -Neurexin dienen können. Für die Cassetten gibt es keine Referenzstruktur, doch existieren Referenzstrukturen für die EGF-Domäne, so dass eine Modellierung mehrerer Konformationen einer Gesamtstruktur von α -Neurexin auf Basis der LNS-Dimere und EGF-Domänen erfolgen kann. In gezielten Mutageneseexperimenten ließen sich die Modelle wie hier für den Neurexin/Neuroigin Komplex überprüfen.

In dieser Arbeit wurden Mutationen in Neuroigin und Neurexin identifiziert, die eine Calciumbindung erhalten, aber die Komplexbildung verhindern. Diese Mutationen können nun in Zellkultur-, Elektrophysiologie- und Tiermodell-Experimenten erprobt werden und erlauben eine Differenzierung der Calcium-Transporter oder -Pufferfunktion von Neurexinen und der transsynaptischen Komplexbildung. Da nur α -Neurexine einen Einfluss auf Calciumkanäle gezeigt haben, könnte die mehrfache Calciumbindung an α -Neurexin hierfür verantwortlich sein.

Weiterhin ungeklärt ist die zuckerbindende Funktion von LNS Domänen im synaptischen Spalt. Durch die genaue Kenntnis der Neuroiginbindungsstelle, lassen sich nun die Zuckerbindungsstellen auf der α LNS6 und den anderen LNS Domänen verändern, ohne die Neuroiginbindung zu beeinflussen und umgekehrt. Hierdurch ließe sich klären, ob noch weitere Neurexin-vermittelte transsynaptische Komplexe unabhängig zum Neuroiginkomplex eine synaptogenetische Wirkungen ausüben könnten.

Die Analyse der bi-direktionalen Kommunikation im synaptischen Spalt von Proteinen, Glykoproteinen und Glykanen bedarf noch umfangreicher Untersuchungen, zu denen der hoch-spezifische Komplex von Neurexin und Neuroigin einen entscheidenden Anfang gemacht hat.

6 Zusammenfassung

Die neuronale chemische Synapse ist eine strukturell und funktionell hoch komplexe Schnittstelle zwischen Nervenzellen. Der molekulare Aufbau und die vielfältigen Wechselwirkungen synaptischer Proteine sind noch weitestgehend unbekannt. Viele für die Funktion der Synapse wichtigen Prozesse sind calciumabhängig. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die größte Gruppe der calciumbindenden Proteine, die EF Hand Proteine strukturell charakterisiert. Diese Proteinfamilie besitzt ein breites Spektrum an Konformationen, die es erschweren, neue Proteine allein auf Basis der Primärsequenz funktionell einzuordnen. Aus diesem Grunde wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem neue Proteinsequenzen zu allen möglichen Konformerstrukturen modelliert werden können. Mit Hilfe dieses Konformationsraummodells konnte der Myristoyl-Schalter des Neuronalen Calciumsensor (NCS) Proteins VILIP und ein neuer Übergangszustand von NCS Proteinen korrekt vorhergesagt werden. Weiterhin konnten die Bindungsstellen von EF Hand Proteinen auf neuen Bindungspartnern gefunden werden wie z.B. die Caldendrinbindungsstelle auf Jacob. Im zweiten Teil wurde dieses Verfahren für die effiziente Planung von Mutagenesen und die nachfolgende Analyse des transsynaptischen Neurexin/Neuroigin Komplex angewandt. Dieser Komplex scheint eine besondere Rolle im Aufbau und der Erhaltung der synaptischen Verbindung zu haben. Neurexine sind Zelloberflächenproteine, die an Neuroigine unter Bildung eines calciumabhängigen Komplexes binden. Dieser heterophile Komplex wird für die Funktion der Synapse benötigt und Defekte in den Genen beider Proteine werden als erbliche Ursache für Autismus diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurden Mutagenesestudien durchgeführt, um essentielle Reste der Neurexin/Neuroigin Kontaktstelle zu bestimmen. Hierzu wurden mehrere Modelle von Komplexstrukturen entworfen und daraus gezielte Mutationen abgeleitet, die zu einem kompletten Verlust der Komplexbildung führen sollten. Dabei wurde gefunden, dass Neuroigin entgegen früheren Annahmen kein EF Hand Protein zu sein scheint und die EF Hände nicht für die Neurexinbindung erforderlich sind. Stattdessen konnte erstmals eine Calcium-45 Bindung an Neurexin nachgewiesen und die Neuroiginkontaktstelle auf Neurexin fein kartiert werden. Neuroigin bindet demnach an hydrophobe Reste, welche die Calciumbindungstasche von der sechsten LNS in α -Neurexin und der LNS von β -Neurexin in einer neuartigen Weise umgeben. Punktmutationen, die elektrostatische Eigenschaften oder die Oberflächenform veränderten, haben die Calciumkoordination nicht beeinflusst, aber die Neuroiginbindung komplett unterbunden. Im Vergleich dazu führte der Einbau von *splice*-Insertionen in α - und β -Neurexinen und Neuroigin 1 nur zu einer moderaten Reduktion der Komplexbildung. In Neuroiginen scheint die Kontaktstelle weniger ausgeprägt zu sein, da ein Austausch eines entfernten Aspartats die Bindung an Neurexin komplett verhinderte, während Reste an der Kontaktfläche wie sie durch kürzlich publizierte Kristallstrukturen identifiziert wurden keinen Effekt auf die Bindung hatten. Diese unterschiedliche Plastizität in den Kontaktflächen von Neurexin und Neuroigin wurde durch die Berechnung von Bindungsenergien von Wildtyp und mutierten Komplexen auf Basis der β -Neurexin/Neuroigin 1 Kristallstrukturen bestätigt. Desweiteren wurde in Bindungsstudien und vergleichende Strukturanalysen festgestellt, dass die feste hydrophobe Kontaktoberfläche von Neurexinen in gleicherweise für die Bindung an die Neuroiginisoformen 1 bis 4 erforderlich ist. Demgegenüber besitzt Neuroigin 2 womöglich eine alternative Bindungsstelle für Neurexin wie die hier durchgeführten Berechnungen vermuten lassen.

Summary

The neuronal chemical synapse is an structurally and functionally highly complex interface of nerve cells. The molecular constitution and the manifold interactions of synaptic proteins is to great extent still unknown. Several functionally important synaptic processes do require calcium. The first part of this work characterizes the largest family of calciumbinding proteins, the EF Hand proteins. This family has been found to express a wide spectrum of conformations which make it difficult to functionally classify new proteins. To address this challenge a method has been developed to model new protein sequences into all possible conformers. That method of building conformational space models allowed the correct prediction of the myristoyl switch of the neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP and a new conformational transition state of NCS proteins. Additionally, the binding sites of EF Hand proteins of new interaction partners was found as e.g. the binding site of caldendrin on jacob. In the second part that method is used to efficiently design site directed mutations and subsequently analyze the transsynaptic neuroligin/neurexin complex. This complex seemed to play a unique role in synaptogenesis and maturation of the synaptic contact. Neurexins are cell surface proteins which bind to neuroligins forming a calciumdependent complex. This heterophilic complex is required for synaptic function and defects in genes of both proteins correlate with autism. The aim of this work was to use site directed mutagenesis to identify essential residues at the binding interface. Several complex model structures have been generated to facilitate the design mutations that completely block complex formation. It was found that EF hand motifs in neuroligin are degenerated and not required to bind to neurexin as suggested elsewhere. For the first time, calcium-45 binding to neurexin was detected. Performing multiple steps of modeling, mutagenesis and binding studies the binding site for neuroligin could be sharply delineated. Neuroligin binds to hydrophobic residues which surround the calciumbinding pocket and give the sixth LNS domain from α -neurexin and the LNS from β -neurexin a unique property. Point mutations that changed electrostatic and shape properties leave calcium coordination intact but completely inhibited neuroligin binding, whereas alternative splicing in α - and β -neurexins and in neuroligins had a weaker effect on complex formation. In neuroligins, the contact area appears less distinct because exchange of a more distant aspartate completely abolished binding to neurexin but many mutations of predicted interface residues had no effect on binding. Calculating binding energies of wild-type and mutated complexes using the coordinates from recently determined β -neurexin/neuroligin 1 crystal structures confirmed that the contact area in neurexin is rigid and invariable. Additional binding and comparative structural studies reveal that neurexin binds to all neuroligin isoforms using the same hydrophobic contact area. In contrast, neuroligin 2 does not fit into the complex structures of the other isoforms and may have an alternate binding area for neurexins.

7 Referenzen

- Abrahams BS & Geschwind DH. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet*, 9(5), 341-355.
- Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, McQ Gould S, Roodveldt C & Tawfik DS. (2005). The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nat Genet*, 37(1), 73-76.
- Alger BE. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol*, 68(4), 247-286.
- Ames JB, Hamasaki N & Molchanova T. (2002). Structure and calcium-binding studies of a recoverin mutant (E85Q) in an allosteric intermediate state. *Biochemistry*, 41(18), 5776-5787.
- Ames JB, Ishima R, Tanaka T, Gordon JI, Stryer L & Ikura M. (1997). Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*, 389(6647), 198-202.
- Arac D, Boucard AA, Ozkan E, Strop P, Newell E, Südhof TC & Brünger AT. (2007). Structures of Neuroligin-1 and the Neuroligin-1/Neurexin-1beta Complex Reveal Specific Protein-Protein and Protein-Ca(2+) Interactions. *Neuron*, 56(6), 992-1003.
- Banavar JR & Maritan A. (2007). Physics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36, 261-280.
- Bayley H. (2006). Sequencing single molecules of DNA. *Curr Opin Chem Biol*, 10(6), 628-637.
- Beckmann G, Hanke J, Bork P & Reich JG. (1998). Merging extracellular domains: fold prediction for laminin G-like and amino-terminal thrombospondin-like modules based on homology to pentraxins. *J Mol Biol*, 275(5), 725-730.
- Benglopoulos V. (2002). *Functional characterization of neurexophilins in the central nervous system*. Doktorarbeit, Ernst-August Universität, Göttingen.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN & Bourne PE. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 235-242.
- Bers DMA. (1982). A simple method for the accurate determination of free [Ca] in Ca-EGTA solutions. *Am J Physiol*, 242, C404-C408.
- Boucard AA, Chubykin AA, Comoletti D, Taylor P & Südhof TC. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron*, 48(2), 229-236.
- Braithwaite SP, Paul S, Nairn AC & Lombroso PJ. (2006). Synaptic plasticity: one STEP at a time. *Trends Neurosci*, 29(8), 452-458.
- Braunewell K-H, Reissner C & Gundelfinger ED. (2000). Visinin-like proteins (VILIPs) - Emerging role in cross-talk between cellular signaling pathways. In R Pochet (Hrsg.), *CALCIUM The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine*. Brussels, Belgium: Kluwer Academic Publishers.
- Braunewell K-H, Spilker C, Behnisch T & Gundelfinger ED. (1997). The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J Neurochem*, 68(5), 2129-2139.
- Brown EM, Vassilev PM & Hebert SC. (1995). Calcium ions as extracellular messengers. *Cell*, 83(5), 679-682.
- Brünger AT. (1988). X-PLOR (Version 3.1). New Haven, CT: HHMI, DMBB, Yale University.
- Burgoyne RD. (2007). Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat Rev Neurosci*, 8(3), 182.
- Burmeister M, McInnis MG & Zollner S. (2008). Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat Rev Genet*, 9(7), 527-540.

- Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B & Mornon JP. (1997). Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci*, 53(8), 621-645.
- Carafoli E, Santella L, Branca D & Brini M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 36(2), 107-260.
- Castrignano T, De Meo PD, Cozzetto D, Talamo IG & Tramontano A. (2006). The PMDB Protein Model Database. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D306-309.
- Chen X, Liu H, Shim AH, Focia PJ & He X. (2008). Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions. *Nat Struct Mol Biol*, 15(1), 50-56.
- Chih B, Afridi SK, Clark L & Scheiffele P. (2004). Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet*, 13(14), 1471-1477.
- Chih B, Gollan L & Scheiffele P. (2006). Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron*, 51(2), 171-178.
- Cho S, Swaminathan CP, Yang J, Kerzic MC, Guan R, Kieke MC, Kranz DM, Mariuzza RA & Sundberg EJ. (2005). Structural basis of affinity maturation and intramolecular cooperativity in a protein-protein interaction. *Structure*, 13(12), 1775-1787.
- Chubykin AA, Liu X, Comoletti D, Tsigelny I, Taylor P & Südhof TC. (2005). Dissection of synapse induction by neuroligins: effect of a neuroligin mutation associated with autism. *J Biol Chem*, 280(23), 22365-22374.
- Cline H. (2005). Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr Biol*, 15(6), R203-205.
- Coggan JS, Bartol TM, Esquenazi E, Stiles JR, Lamont S, Martone ME, Berg DK, Ellisman MH & Sejnowski TJ. (2005). Evidence for ectopic neurotransmission at a neuronal synapse. *Science*, 309(5733), 446-451.
- Comoletti D, De Jaco A, Jennings LL, Flynn RE, Gaietta G, Tsigelny I, Ellisman MH & Taylor P. (2004). The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing. *J Neurosci*, 24(20), 4889-4893.
- Comoletti D, Flynn R, Jennings LL, Chubykin AA, Matsumura T, Hasegawa H, Südhof TC & Taylor P. (2003). Characterization of the interaction of a recombinant soluble neuroligin-1 with neurexin-1beta. *J Biol Chem*, 278(50), 50497-50505.
- Comoletti D, Flynn RE, Boucard AA, Demeler B, Schirf V, Shi J, Jennings LL, Newlin HR, Südhof TC & Taylor P. (2006). Gene selection, alternative splicing, and post-translational processing regulate neuroligin selectivity for beta-neurexins. *Biochemistry*, 45(42), 12816-12827.
- Comoletti D, Grishaev A, Whitten AE, Tsigelny I, Taylor P & Trewella J. (2007). Synaptic Arrangement of the Neuroligin/beta-Neurexin Complex Revealed by X-Ray and Neutron Scattering. *Structure*, 15(6), 693-705.
- Cox JA, Durussel I, Comte M, Nef S, Nef P, Lenz SE & Gundelfinger ED. (1994). Cation binding and conformational changes in VILIP and NCS-1, two neuron-specific calcium-binding proteins. *J Biol Chem*, 269(52), 32807-32813.
- Craig AM & Kang Y. (2007). Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1), 43-52.
- Cullen BR. (1987). Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol*, 152, 684-704.
- De Jaco A, Comoletti D, Kovarik Z, Gaietta G, Radic Z, Lockridge O, Ellisman MH & Taylor P. (2006). A mutation linked with autism reveals a common mechanism of endoplasmic reticulum retention for the alpha,beta-hydrolase fold protein family. *J Biol Chem*, 281(14), 9667-9676.

- Dean C & Dresbach T. (2006). Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci*, 29(1), 21-29.
- Dean C, Scholl FG, Choih J, DeMaria S, Berger J, Isacoff E & Scheiffele P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci*, 6(7), 708-716.
- DeLano WL. (2002a). The PyMOL Molecular Graphics System: DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- DeLano WL. (2002b). Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr Opin Struct Biol*, 12(1), 14-20.
- Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, Konig I, Landwehr M, Kreutz M, Smalla KH, Richter K, Landgraf P, Reissner C, Böckers TM, Zuschratter W, Spilker C, Seidenbecher CI, Garner CC, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (2008). Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol*, 6(2), e34.
- Dill KA, Ozkan SB, Shell MS & Weikl TR. (2008). The Protein Folding Problem. *Annu Rev Biophys*, 37, 289-316.
- Dill KA, Ozkan SB, Weikl TR, Chodera JD & Voelz VA. (2007). The protein folding problem: when will it be solved? *Curr Opin Struct Biol*, 17(3), 342-346.
- Douglas RJ & Martin KA. (2004). Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci*, 27, 419-451.
- Dresbach T, Altmann WD & Gundelfinger ED. (2003). Neurotransmitterfreisetzung an chemischen Synapsen: Zusammenbau und molekulare Organisation der aktiven Zone. *Neuroforum*, 3(3), 79-86.
- Dresbach T, Neeb A, Meyer G, Gundelfinger ED & Brose N. (2004). Synaptic targeting of neuroligin is independent of neurexin and SAP90/PSD95 binding. *Mol Cell Neurosci*, 27(3), 227-235.
- Durand P & Mornon JP. (1998). Paper presented at the 12th Annual International Symposium on High Performance Computing Systems and Applications, Edmonton, Canada.
- Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB & Wood SP. (1994). Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature*, 367(6461), 338-345.
- Eswar N, Sali A, John BT & David JT. (2007). Comparative Modeling of Drug Target Proteins. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (S. 215). Oxford: Elsevier.
- Evans RM & Zamponi GW. (2006). Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends Neurosci*, 29(11), 617-624.
- Fabrichny IP, Leone P, Sulzenbacher G, Comoletti D, Miller MT, Taylor P, Bourne Y & Marchot P. (2007). Structural Analysis of the Synaptic Protein Neuroligin and Its beta-Neurexin Complex: Determinants for Folding and Cell Adhesion. *Neuron*, 56(6), 979-991.
- Fairless R, Reissner C & Missler M. (2006). Role of neuroligin binding to neurexins in synaptic organization. In A El-Husseini & A Dityatev (Hrsg.), *Molecular Mechanisms of Synaptogenesis* (S. 111-124). Heidelberg: Springer.
- Fan H & Mark AE. (2003). Relative stability of protein structures determined by X-ray crystallography or NMR spectroscopy: a molecular dynamics simulation study. *Proteins*, 53(1), 111-120.
- Fan H & Mark AE. (2004). Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. *Protein Sci*, 13(1), 211-220.
- Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, Cook EH, Jr., Skinner C, Schwartz CE & Sommer SS. (2006). High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett*, 409(1), 10-13.

- Few AP, Lautermilch NJ, Westenbroek RE, Scheuer T & Catterall WA. (2005). Differential regulation of CaV2.1 channels by calcium-binding protein 1 and visinin-like protein-2 requires N-terminal myristoylation. *J Neurosci*, 25(30), 7071-7080.
- Fogel AI, Akins MR, Krupp AJ, Stagi M, Stein V & Biederer T. (2007). SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J Neurosci*, 27(46), 12516-12530.
- Fox BG, Goulding C, Malkowski MG, Stewart L & Deacon A. (2008). Structural genomics: from genes to structures with valuable materials and many questions in between. *Nat Methods*, 5(2), 129-132.
- Friel DD & Chiel HJ. (2008). Calcium dynamics: analyzing the Ca²⁺ regulatory network in intact cells. *Trends Neurosci*, 31(1), 8-19.
- Frotscher M, Zhao S, Graber W, Drakew A & Studer D. (2007). New ways of looking at synapses. *Histochem Cell Biol*, 128(2), 91-96.
- Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T & Mornon JP. (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett*, 224(1), 149-155.
- Garner CC, Waites CL & Ziv NE. (2006). Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. *Cell Tissue Res*, 326(2), 249-262.
- Grabarek Z. (2006). Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol*, 359(3), 509-525.
- Graf ER, Kang Y, Hauner AM & Craig AM. (2006). Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 beta LNS domain. *J Neurosci*, 26(16), 4256-4265.
- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW & Craig AM. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, 119(7), 1013-1026.
- Grant SG, Marshall MC, Page KL, Cumiskey MA & Armstrong JD. (2005). Synapse proteomics of multiprotein complexes: en route from genes to nervous system diseases. *Hum Mol Genet*.
- Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL & Muller YA. (2000). Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *Embo J*, 19(4), 504-512.
- Gsponer J, Christodoulou J, Cavalli A, Bui JM, Richter B, Dobson CM & Vendruscolo M. (2008). A coupled equilibrium shift mechanism in calmodulin-mediated signal transduction. *Structure*, 16(5), 736-746.
- Guerois R, Nielsen JE & Serrano L. (2002). Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *J Mol Biol*, 320(2), 369-387.
- Guex N & Peitsch MC. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.
- Gutiérrez R. (2005). The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends Neurosci*, 28(6), 297.
- Harel M, Kleywegt GJ, Ravelli RB, Silman I & Süßman JL. (1995). Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure*, 3(12), 1355-1366.
- Harrison D, Hussain SA, Combs AC, Ervasti JM, Yurchenco PD & Hohenester E. (2007). Crystal structure and cell surface anchorage sites of laminin alpha1LG4-5. *J Biol Chem*, 282(15), 11573-11581.
- Haynes LP, Fitzgerald DJ, Wareing B, O'Callaghan DW, Morgan A & Burgoyne RD. (2006). Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin delta. *Proteomics*, 6(6), 1822-1832.

- Hilgenberg LG, Su H, Gu H, O'Dowd DK & Smith MAc. (2006). Alpha₃Na⁺/K⁺-ATPase is a neuronal receptor for agrin. *Cell*, 125(2), 359-369.
- Hoffman RC, Jennings LL, Tsigelny I, Comoletti D, Flynn RE, Südhof TC & Taylor P. (2004). Structural characterization of recombinant soluble rat neuroligin 1: mapping of secondary structure and glycosylation by mass spectrometry. *Biochemistry*, 43(6), 1496-1506.
- Hohenester E & Engel J. (2002). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol*, 21(2), 115-128.
- Hohenester E, Tisi D, Talts JF & Timpl R. (1999). The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol Cell*, 4(5), 783-792.
- Holm L & Sander C. (1995). Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci*, 20(11), 478-480.
- Holm L & Sander C. (1996). Mapping the protein universe. *Science*, 273(5275), 595-603.
- Holmes DS & Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, 114(1), 193-197.
- Houdusse A & Cohen C. (1995). Target sequence recognition by the calmodulin superfamily: implications from light chain binding to the regulatory domain of scallop myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(23), 10644-10647.
- Houdusse A & Cohen C. (1996). Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure*, 4(1), 21-32.
- Houdusse A, Gaucher JF, Kremntsova E, Mui S, Trybus KM & Cohen C. (2006). Crystal structure of apo-calmodulin bound to the first two IQ motifs of myosin V reveals essential recognition features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(51), 19326-19331.
- Hussain NK & Sheng M. (2005). Neuroscience. Making synapses: a balancing act. *Science*, 307(5713), 1207-1208.
- Hwang JY & Koch KW. (2002). Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2. *Biochemistry*, 41(43), 13021-13028.
- Ichtchenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C & Südhof TC. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell*, 81(3), 435-443.
- Ichtchenko K, Nguyen T & Südhof TC. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem*, 271(5), 2676-2682.
- Ikura M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci*, 21(1), 14-17.
- Ikura M & Ames JB. (2005). Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: Two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C & Bourgeron T. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*, 34(1), 27-29.
- Jonas P, Bischofberger J & Sandkuhler J. (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science*, 281(5375), 419-424.
- Jones DT. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 292(2), 195-202.
- Jones TA & Kjeldgaard M. (1998). Essential O - software manual. Uppsala.

- Kang Y, Zhang X, Dobie F, Wu H & Craig AM. (2008). Induction of GABAergic Postsynaptic Differentiation by {alpha}-Neurexins. *J Biol Chem*, 283(4), 2323-2334.
- Kauer JA & Malenka RC. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci*, 8(11), 844-858.
- Koch AW, Bozic D, Pertz O & Engel J. (1999). Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol*, 9(2), 275-281.
- Koehnke J, Jin X, Budreck EC, Posy S, Scheiffele P, Honig B & Shapiro L. (2008a). Crystal structure of the extracellular cholinesterase-like domain from neuroligin-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 1873-1878.
- Koehnke J, Jin X, Trbovic N, Katsamba PS, Brasch J, Ahlsen G, Scheiffele P, Honig B, Palmer AG, 3rd & Shapiro L. (2008b). Crystal Structures of beta-Neurexin 1 and beta-Neurexin 2 Ectodomains and Dynamics of Splice Insertion Sequence 4. *Structure*, 16(3), 410-421.
- Kordel J, Skelton NJ, Akke M & Chazin WJ. (1993). High-resolution structure of calcium-loaded calbindin D9k. *J Mol Biol*, 231(3), 711-734.
- Kretsinger RH, Nockolds CE, Coffee CJ & Bradshaw RA. (1972). The structure of a calcium-binding protein from carp muscle. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 36, 217-220.
- Kurakin A, Swistowski A, Wu SC & Bredesen DE. (2007). The PDZ domain as a complex adaptive system. *PLoS ONE*, 2(9), e953.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lamprecht R & LeDoux J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci*, 5(1), 45-54.
- Laumonier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C & Briault S. (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet*, 74(3), 552-557.
- Lautermilch NJ, Few AP, Scheuer T & Catterall WA. (2005). Modulation of CaV2.1 channels by the neuronal calcium-binding protein visinin-like protein-2. *J Neurosci*, 25(30), 7062-7070.
- Leppanen VM, Tossavainen H, Permi P, Lehtio L, Ronnholm G, Goldman A, Kilpelainen I & Pihlajamaa T. (2007). Crystal structure of the amino-terminal NC4 domain of collagen IX, a zinc binding member of the LNS domain family. *J Biol Chem*, 282(32), 23219-23230.
- Lewit-Bentley A & Rety S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 10(6), 637-643.
- Li KW, Hornshaw MP, Van Der Schors RC, Watson R, Tate S, Casetta B, Jimenez CR, Gouwenberg Y, Gundelfinger ED, Smalla KH & Smit AB. (2004). Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density. Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology. *J Biol Chem*, 279(2), 987-1002.
- Li KW, Hornshaw MP, van Minnen J, Smalla KH, Gundelfinger ED & Smit AB. (2005). Organelle proteomics of rat synaptic proteins: correlation-profiling by isotope-coded affinity tagging in conjunction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to reveal post-synaptic density specific proteins. *J Proteome Res*, 4(3), 725-733.
- Li KW, Miller S, Klychnikov O, Loos M, Stahl-Zeng J, Spijker S, Mayford M & Smit AB. (2007). Quantitative proteomics and protein network analysis of hippocampal synapses of CaMKIIalpha mutant mice. *J Proteome Res*, 6(8), 3127-3133.
- Li SS. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*, 390(Pt 3), 641-653.
- Lise MF & El-Husseini A. (2006). The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci*, 63(16), 1833-1849.

- Lu T, Rubio ME & Trussell LO. (2008). Glycinergic transmission shaped by the corelease of GABA in a mammalian auditory synapse. *Neuron*, 57(4), 524-535.
- Luthman H & Magnusson G. (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res*, 11(5), 1295-1308.
- Maiti R, Van Domselaar GH & Wishart DS. (2005). MovieMaker: a web server for rapid rendering of protein motions and interactions. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue), W358-362.
- Marino MJ, Williams M, John BT & David JT. (2007). Central Nervous System Drugs Overview. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (S. 1). Oxford: Elsevier.
- Masius H. (2007). *Translokation und Verteilung von Neurexinen in vitro und in vivo*. Doktorarbeit, Ernst-August Universität, Göttingen.
- Matsubara M, Jing T, Kawamura K, Shimojo N, Titani K, Hashimoto K & Hayashi N. (2005). Myristoyl moiety of HIV Nef is involved in regulation of the interaction with calmodulin in vivo. *Protein Sci*, 14(2), 494-503.
- Matsubara M, Nakatsu T, Kato H & Taniguchi H. (2004). Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Embo J*, 23(4), 712-718.
- Matsui K & Jahr CE. (2003). Ectopic release of synaptic vesicles. *Neuron*, 40(6), 1173-1183.
- Matthews EE, Zoonens M & Engelman DM. (2006). Dynamic helix interactions in transmembrane signaling. *Cell*, 127(3), 447-450.
- McAllister AK. (2007). Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annu Rev Neurosci*, 30, 425-450.
- Melia TJ, Jr. (2007). Putting the clamps on membrane fusion: how complexin sets the stage for calcium-mediated exocytosis. *FEBS Lett*, 581(11), 2131-2139.
- Mikhaylova M, Sharma Y, Reissner C, Nagel F, Aravind P, Rajini B, Smalla KH, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (2006). Neuronal Ca²⁺ signaling via caldendrin and calneurons. *Biochim Biophys Acta*, 1763(11), 1229-1237.
- Missler M, Hammer RE & Südhof TC. (1998). Neurexophilin binding to alpha-neurexins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit. *J Biol Chem*, 273(52), 34716-34723.
- Missler M & Südhof TC. (1998). Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet*, 14(1), 20-26.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K & Südhof TC. (2003). Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 423(6943), 939-948.
- Moreira IS, Fernandes PA & Ramos MJ. (2007). Hot spots--a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins*, 68(4), 803-812.
- Mori MX, Vander Kooi CW, Leahy DJ & Yue DT. (2008). Crystal structure of the CaV2 IQ domain in complex with Ca²⁺/calmodulin: high-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca²⁺. *Structure*, 16(4), 607-620.
- Mullis KB & Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350.
- Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T & Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, 247(4), 536-540.
- Nakagawa T, Futai K, Lashuel HA, Lo I, Okamoto K, Walz T, Hayashi Y & Sheng M. (2004). Quaternary structure, protein dynamics, and synaptic function of SAP97 controlled by L27 domain interactions. *Neuron*, 44(3), 453-467.

- Neves G, Cooke SF & Bliss TV. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), 65-75.
- Nguyen T & Südhof TC. (1997). Binding properties of neuroligin 1 and neuroligin 2 reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *J Biol Chem*, 272(41), 26032-26039.
- Nicoll RA & Malenka RC. (1998). A tale of two transmitters. *Science*, 281(5375), 360-361.
- O'Callaghan DW, Ivings L, Weiss JL, Ashby MC, Tepikin AV & Burgoyne RD. (2002). Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem*, 277(16), 14227-14237.
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M & Yokoyama S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110(6), 775-787.
- Okabe S. (2007). Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol Cell Neurosci*, 34(4), 503-518.
- Olson MV. (2008). Human genetics: Dr Watson's base pairs. *Nature*, 452(7189), 819-820.
- Otterbein LR, Kordowska J, Witte-Hoffmann C, Wang CL & Dominguez R. (2002). Crystal structures of S100A6 in the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound states: the calcium sensor mechanism of S100 proteins revealed at atomic resolution. *Structure*, 10(4), 557-567.
- Owens DF & Kriegstein AR. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*, 3(9), 715-727.
- Pardo CA & Eberhart CG. (2007). The neurobiology of autism. *Brain Pathol*, 17(4), 434-447.
- Pawlowski K, Bierzynski A & Godzik A. (1996). Structural diversity in a family of homologous proteins. *J Mol Biol*, 258(2), 349-366.
- Pei J, Tang M & Grishin NV. (2008). PROMALS3D web server for accurate multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res*.
- Petoukhov MV, Eady NA, Brown KA & Svergun DI. (2002). Addition of missing loops and domains to protein models by x-ray solution scattering. *Biophys J*, 83(6), 3113-3125.
- Pieper U, Eswar N, Davis FP, Braberg H, Madhusudhan MS, Rossi A, Marti-Renom M, Karchin R, Webb BM, Eramian D, Shen MY, Kelly L, Melo F & Sali A. (2006). MODBASE: a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D291-295.
- Pottgiesser J, Maurer P, Mayer U, Nischt R, Mann K, Timpl R, Krieg T & Engel J. (1994). Changes in calcium and collagen IV binding caused by mutations in the EF hand and other domains of extracellular matrix protein BM-40 (SPARC, osteonectin). *J Mol Biol*, 238(4), 563-574.
- Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Brownlee GG & Stuart D. (1995). The structure of a Ca²⁺-binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. *Cell*, 82(1), 131-141.
- Remaut H & Waksman G. (2006). Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends Biochem Sci*, 31(8), 436-444.
- Rhoads AR & Friedberg F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*, 11(5), 331-340.
- Rosales CR, Osborne KD, Zuccarino GV, Scheiffle P & Silverman MA. (2005). A cytoplasmic motif targets neuroligin-1 exclusively to dendrites of cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 22(9), 2381-2386.
- Rost B & O'Donoghue S. (1997). Sisyphus and prediction of protein structure. *Comput Appl Biosci*, 13(4), 345-356.

- Rudenko G, Hohenester E & Muller YA. (2001). LG/LNS domains: multiple functions -- one business end? *Trends Biochem Sci*, 26(6), 363-368.
- Rudenko G, Nguyen T, Chelliah Y, Südhof TC & Deisenhofer J. (1999). The structure of the ligand-binding domain of neurexin Ibeta: regulation of LNS domain function by alternative splicing. *Cell*, 99(1), 93-101.
- Sammond DW, Eletr ZM, Purbeck C, Kimple RJ, Siderovski DP & Kuhlman B. (2007). Structure-based protocol for identifying mutations that enhance protein-protein binding affinities. *J Mol Biol*, 371(5), 1392-1404.
- Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Chubykin AA, Mozhayeva MG, Südhof TC & Kavalali ET. (2005). Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J Neurosci*, 25(1), 260-270.
- Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Gohring W, Ullrich A, Timpl R & Hohenester E. (2006). Structural basis for Gas6-Axl signalling. *Embo J*, 25(1), 80-87.
- Sauder MJ. (1999). blast2model (Version 1.0) [perl script]. Philadelphia, PA, USA.
- Schallreuter KU, Gibbons NC, Elwary SM, Parkin SM & Wood JM. (2007). Calcium-activated butyrylcholinesterase in human skin protects acetylcholinesterase against suicide inhibition by neurotoxic organophosphates. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(4), 1069-1074.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R & Serafini T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101(6), 657-669.
- Schmidt S, Bork P & Dandekar T. (2002). A versatile structural domain analysis server using profile weight matrices. *J Chem Inf Comput Sci*, 42(2), 405-407.
- Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F & Serrano L. (2005). The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue), W382-388.
- Seidenbecher CI, Landwehr M, Smalla KH, Kreutz M, Dieterich DC, Zuschratter W, Reissner C, Hammarback JA, Böckers TM, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (2004). Caldendrin but not calmodulin binds to light chain 3 of MAP1A/B: an association with the microtubule cytoskeleton highlighting exclusive binding partners for neuronal Ca(2+)-sensor proteins. *J Mol Biol*, 336(4), 957-970.
- Seidenbecher CI, Langnaese K, Sanmarti-Vila L, Böckers TM, Smalla KH, Sabel BA, Garner CC, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (1998). Caldendrin, a novel neuronal calcium-binding protein confined to the somato-dendritic compartment. *J Biol Chem*, 273(33), 21324-21331.
- Shapiro L, Love J & Colman DR. (2007). Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci*, 30, 451-474.
- Sheckler LR, Henry L, Sugita S, Südhof TC & Rudenko G. (2006). Crystal structure of the second LNS/LG domain from neurexin 1alpha: Ca2+ binding and the effects of alternative splicing. *J Biol Chem*, 281(32), 22896-22905.
- Shen KC, Kuczynska DA, Wu JJ, Murray BH, Sheckler LR & Rudenko G. (2008). Regulation of neurexin 1beta tertiary structure and ligand binding through alternative splicing. *Structure*, 16(3), 422-431.
- Shen Y, Lee YS, Soelaiman S, Bergson P, Lu D, Chen A, Beckingham K, Grabarek Z, Mrksich M & Tang WJ. (2002). Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylyl cyclase exotoxins. *Embo J*, 21(24), 6721-6732.
- Sheng M & Hoogenraad CC. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, 76, 823-847.
- Shuman CF, Jiji R, Kerfeldt KS & Linse S. (2006). Reconstitution of calmodulin from domains and subdomains: Influence of target peptide. *J Mol Biol*, 358(3), 870-881.
- Singer JH. (2008). GABA is an endogenous ligand for synaptic glycine receptors. *Neuron*, 57(4), 475-477.

- Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC & Brose N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(3), 1100-1105.
- Stetefeld J, Alexandrescu AT, Maciejewski MW, Jenny M, Rathgeb-Szabo K, Schulthess T, Landwehr R, Frank S, Ruegg MA & Kammerer RA. (2004). Modulation of agrin function by alternative splicing and Ca²⁺ binding. *Structure*, 12(3), 503-515.
- Strumpf H, Smalla KH, Landwehr M, Reissner C, Gundelfinger ED, Kreuz MR & Seidenbecher CI. (2003). *Interaction of the Neuronal Calcium-Binding Protein Caldendrin with Postsynaptic Scaffolding Molecules*. Paper presented at the 29th Göttingen Neurobiology Conference and the 5th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen.
- Sugita S, Saito F, Tang J, Satz J, Campbell K & Südhof TC. (2001). A stoichiometric complex of neuroligins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*, 154(2), 435-445.
- Suhre K & Sanejouand YH. (2004). ElNemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue), W610-614.
- Svergun DI & Koch MH. (2002). Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol*, 12(5), 654-660.
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L, Feuk L, Qian C, Bryson SE, Jones MB, Marshall CR, Scherer SW, Vieland VJ, Bartlett C, Mangin LV, Goedken R, Segre A, Pericak-Vance MA, Cuccaro ML, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, Betancur C, Bourgeron T, Gillberg C, Leboyer M, Buxbaum JD, Davis KL, Hollander E, Silverman JM, Hallmayer J, Lotspeich L, Sutcliffe JS, Haines JL, Folstein SE, Piven J, Wassink TH, Sheffield V, Geschwind DH, Bucan M, Brown WT, Cantor RM, Constantino JN, Gilliam TC, Herbert M, Lajonchere C, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Miller J, Nelson S, Samango-Sprouse CA, Spence S, State M, Tanzi RE, Coon H, Dawson G, Devlin B, Estes A, Flodman P, Klei L, McMahon WM, Minshew N, Munson J, Korvatska E, Rodier PM, Schellenberg GD, Smith M, Spence MA, Stodgell C, Tepper PG, Wijsman EM, Yu CE, Roge B, Mantoulan C, Wittmeyer K, Poustka A, Felder B, Klauck SM, Schuster C, Poustka F, Bolte S, Feineis-Matthews S, Herbrecht E, Schmotzer G, Tsiantis J, Papanikolaou K, Maestrini E, Bacchelli E, Blasi F, Carone S, Toma C, Van Engeland H, De Jonge M, Kemner C, Koop F, Langemeijer M, Hijimans C, Staal WG, Baird G, Bolton PF, Rutter ML, Weisblatt E, Green J, Aldred C, Wilkinson JA, Pickles A, Le Couteur A, Berney T, McConachie H, Bailey AJ, Francis K, Honeyman G, Hutchinson A, Parr JR, Wallace S, Monaco AP, Barnby G, Kobayashi K, Lamb JA, Sousa I, Sykes N, Cook EH, Guter SJ, Leventhal BL, Salt J, Lord C, Corsello C, Hus V, Weeks DE, Volkmar F, Tauber M, Fombonne E & Shih A. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*, 39(3), 319-328.
- Szebenyi DM & Moffat K. (1986). The refined structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. Molecular details, ion binding, and implications for the structure of other calcium-binding proteins. *J Biol Chem*, 261(19), 8761-8777.
- Südhof TC. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, 27, 509-547.
- Tabuchi K, Biederer T, Butz S & Südhof TC. (2002). CASK participates in alternative tripartite complexes in which Mint 1 competes for binding with caskin 1, a novel CASK-binding protein. *J Neurosci*, 22(11), 4264-4273.
- Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM & Südhof TC. (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science*, 318(5847), 71-76.
- Takeda S, Yamashita A, Maeda K & Maeda Y. (2003). Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature*, 424(6944), 35-41.
- Talebizadeh Z, Lam DY, Theodoro MF, Bittel DC, Lushington GH & Butler MG. (2006). Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism. *J Med Genet*, 43(5), e21.

- Tanaka T, Ames JB, Harvey TS, Stryer L & Ikura M. (1995). Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature*, 376(6539), 444-447.
- Taniguchi H, Gollan L, Scholl FG, Mahadomrongkul V, Dobler E, Limthong N, Peck M, Aoki C & Scheiffele P. (2007). Silencing of neuroligin function by postsynaptic neurexins. *J Neurosci*, 27(11), 2815-2824.
- Tavares GA, Panepucci EH & Brünger AT. (2001). Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Mol Cell*, 8(6), 1313-1325.
- Thorpe AJ, Taylor CP, John BT & David JT. (2007). Calcium Channel [alpha]2-[delta] Ligands: Gabapentin and Pregabalin. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (S. 227). Oxford: Elsevier.
- Tseng CN, Zhang L, Cascio M & Wang ZZ. (2003). Calcium plays a critical role in determining the acetylcholine receptor-clustering activities of alternatively spliced isoforms of Agrin. *J Biol Chem*, 278(19), 17236-17245.
- Tsigelny I, Shindyalov IN, Bourne PE, Südhof TC & Taylor P. (2000). Common EF-hand motifs in cholinesterases and neuroligins suggest a role for Ca²⁺ binding in cell surface associations. *Protein Sci*, 9(1), 180-185.
- Tsutakawa SE, Hura GL, Frankel KA, Cooper PK & Tainer JA. (2007). Structural analysis of flexible proteins in solution by small angle X-ray scattering combined with crystallography. *J Struct Biol*, 158(2), 214-223.
- Turrigiano G. (2007). Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Curr Opin Neurobiol*, 17(3), 318-324.
- Ullrich B, Ushkaryov YA & Südhof TC. (1995). Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron*, 14(3), 497-507.
- Ushkaryov YA, Hata Y, Ichtchenko K, Moomaw C, Afendis S, Slaughter CA & Südhof TC. (1994). Conserved domain structure of beta-neurexins. Unusual cleaved signal sequences in receptor-like neuronal cell-surface proteins. *J Biol Chem*, 269(16), 11987-11992.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M & Südhof TC. (1992). Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science*, 257(5066), 50-56.
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Südhof TC & Brose N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, 51(6), 741-754.
- Varoqueaux F, Jamain S & Brose N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol*, 83(9), 449-456.
- Vashlishan AB, Madison JM, Dybbs M, Bai J, Sieburth D, Ch'ng Q, Tavazoie M & Kaplan JM. (2008). An RNAi Screen Identifies Genes that Regulate GABA Synapses. *Neuron*, 58(3), 346-361.
- Venkataraman V, Duda T, Ravichandran S & Sharma RK. (2008). Neurocalcin d Modulation of ROS-GC1, a New Model of Ca²⁺ Signaling. *Biochemistry*, 47(25), 6590-6601.
- Waites CL, Craig AM & Garner CC. (2005). Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci*, 28, 251-274.
- Washbourne P, Dityatev A, Scheiffele P, Biederer T, Weiner JA, Christopherson KS & El-Husseini A. (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci*, 24(42), 9244-9249.
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA & Rothberg JM. (2008). The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*, 452(7189), 872-876.
- Wingard JN, Chan J, Bosanac I, Haeseleer F, Palczewski K, Ikura M & Ames JB. (2005). Structural analysis of Mg²⁺ and Ca²⁺ binding to CaBP1, a neuron-specific regulator of calcium channels. *J Biol Chem*, 280(45), 37461-37470.

- Wu H, Reissner C, Kuhlendahl S, Coblenz B, Reuver S, Kindler S, Gundelfinger ED & Garner CC. (2000). Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *Embo J*, 19(21), 5740-5751.
- Yamada S & Nelson WJ. (2007). Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annu Rev Biochem*, 76, 267-294.
- Yamauchi E, Nakatsu T, Matsubara M, Kato H & Taniguchi H. (2003). Crystal structure of a MARCKS peptide containing the calmodulin-binding domain in complex with Ca²⁺-calmodulin. *Nat Struct Biol*, 10(3), 226-231.
- Yamniuk AP & Vogel HJ. (2004). Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. *Mol Biotechnol*, 27(1), 33-57.
- Yang W, Lee HW, Hellinga H & Yang JJ. (2002). Structural analysis, identification, and design of calcium-binding sites in proteins. *Proteins*, 47(3), 344-356.
- Yap KL, Ames JB, Swindells MB & Ikura M. (1999). Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins*, 37(3), 499-507.
- Yap KL, Ames JB, Swindells MB & Ikura M. (2002). Vector geometry mapping. A method to characterize the conformation of helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Methods Mol Biol*, 173, 317-324.
- Zhang W, Rohlmann A, Sargsyan V, Aramuni G, Hammer RE, Südhof TC & Missler M. (2005). Extracellular domains of alpha-neurexins participate in regulating synaptic transmission by selectively affecting N- and P/Q-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci*, 25(17), 4330-4342.

8 Anhang

Tabelle 8-1. **Modellkomplexe von Neurexin und Neuroligin auf Basis von Acetylcholinesterasestrukturen (pdb: 1fss, 1mah) und der LNS von β -Neurexin (1c4r).** Vier Neurexin/Neuroligin Komplexe wurden manuell erstellt und die im Text beschriebenen Mutationen ausgewählt (Ergebnisse, 3.2.8). Die Koordinaten der später kristallisierten Neurexin/Neuroligin Struktur (PDB: 3b3q) wurden in Domänen getrennt und über die Docking-Verfahren 3D Garden und ZDOCK wieder zusammengefügt (s. Methoden, 2.3.4.1). Die vier manuellen Komplexe mit Kontakten an den Positionen 100, 271, 399 und 557 wurden von den Docking-Verfahren ebenfalls gefunden, wobei 3D Garden die besten Ergebnisse lieferte. Interessanterweise hatte ein Komplex mit einer Interaktion von D271 (Nr. 2) an das Neurexin-gebundene Calcium den höchsten Rang, was diese Stelle als eine gute Alternative zur kristallisierten Bindungsstelle (Nr. 3) klassifiziert, auch wenn sie wie im Text beschrieben nicht genutzt wird.

Nr.	Position in Neuroligin	Calcium-bindung	Hydrophober Kontakt	Rang nach Docking	
				3D Garden	ZDOCK
1	100	E99	P100		19
2	271	D271	G266, L273	3	102
3	399	E297	G396, L399	4	50
4	557	-	A557, V558		161

Tabelle 8-2. Kalkulierte Bindungsenergien von Wildtyp und verschiedenen Mutationen des Neurexin/Neuroigin Komplexes. Mutationen, die zu positive Bindungsenergien (ene) führen, haben in Experimenten die Komplexbildung verhindert (Tabellen 3-1 und 3-2): S107R, L135R, L234S+I236S+N238D, I236R und N238R. Bis auf die Mutation L234S+I236S+N238D, welche ausschliesslich die den Energiegewinn aus hydrophoben Wechselwirkungen herabsetzt, erzeugen diese Mutationen energetisch ungünstige Überlappungen der van der Waals Radien (*clashes*). Die Mutation G155V+T156A führt zu einem van der Waals *clash*, was den hier gemachten experimentellen Befunden entspricht (Abb. 3-9) ergibt aber keine positiven ΔG Werte (ene), was die ungleiche Wichtung der Energierterme widerspiegelt.

Die Daten wurden mit dem Program FoldX (<http://foldx.crg.es/>) unter Verwendung der Koordinaten 3b3q aus der Protein Datenbank (PDB) berechnet. Abkürzungen der Energierterme: hb = Wasserstoffbrücken-, vw = vanderWaals-, pol = polare-, sc = Seitenketten-, mc = Hauptketten-, wtbr = Wasserbrücken-, hyd = hydrophobe-, el = elektrostatische Wechselwirkungen, vwcl = vanderWaals Überlappung, ene = totale freie Energie ΔG .

	Energy terms										$\Delta\Delta G$
	hb	vw	pol	sc	mc	wtbr	hyd	el	vwcl	ene	
Nrxn/Nlgn Complex											
Wild Type	-10,31	-7,68	20,85	6,23	1,50	-3,89	-13,26	-0,61	0,89	-6,28	
Neurexin											
N103A+D104A+R105A+P106A	-7,51	-7,51	19,62	4,65	1,55	-3,87	-13,11	-0,55	0,89	-5,83	0,45
S107A+T108A+R109A	-10,31	-6,87	17,72	5,70	1,55	-0,50	-12,45	-0,22	0,74	-4,64	1,64
S107R	-10,31	-9,54	26,04	8,16	1,40	-1,43	-16,19	0,06	52,06	50,25	56,53
R112E	-10,31	-7,68	20,85	6,27	1,49	-3,93	-13,25	-0,61	0,89	-6,29	-0,01
T119A+V120A+Q121A+K122A	-10,31	-7,68	20,85	6,24	1,49	-3,88	-13,26	-0,61	0,90	-6,28	0,00
S132A+S133A+G134A+L135A	-10,31	-7,02	20,27	5,99	1,49	-3,87	-11,81	-0,61	0,87	-5,01	1,27
L135R	-14,51	-8,19	25,00	8,04	1,49	-3,88	-13,55	-0,82	12,12	5,72	12,00
D137R	-13,01	-7,70	21,78	6,64	1,49	-4,30	-13,27	-1,16	0,90	-8,63	-2,35
D137S	-11,71	-7,69	21,77	6,18	1,50	-3,86	-13,29	-0,98	0,89	-7,20	-0,92
V154A+G155A+T156A+D157A	-10,31	-7,76	21,20	6,23	1,51	-3,89	-13,43	-0,67	1,32	-5,81	0,47
G155V+T156A	-10,31	-7,94	21,12	6,40	1,49	-3,89	-13,97	-0,58	1,92	-5,75	0,53
I167A+I168A+N169A+D170A	-10,31	-7,68	20,85	6,23	1,49	-3,89	-13,25	-0,66	0,89	-6,32	-0,04
D190A+S191A+W192A+P193A	-10,31	-7,68	20,85	6,22	1,49	-3,89	-13,26	-0,67	0,89	-6,35	-0,07
R232A+Q233A+L234A+T235A	-9,71	-6,81	19,50	5,29	1,52	-3,80	-11,55	-0,06	0,60	-5,03	1,25
L234S+I236S+N238D	-11,71	-6,35	22,92	5,98	1,57	-1,23	-9,99	0,57	0,45	2,20	8,48
I236R	-11,06	-8,64	25,91	7,39	1,53	-3,85	-13,87	-1,67	29,94	25,68	31,96
N238G	-11,71	-7,08	20,37	6,18	1,49	-2,86	-12,37	-0,65	0,88	-5,76	0,52
N238R	-13,41	-8,74	25,34	7,69	1,49	-2,64	-14,92	-2,52	28,22	20,49	26,77
K248A+E249A+Q250A+G251A+Q252A	-10,31	-7,68	20,85	6,23	1,49	-3,88	-13,25	-0,61	0,89	-6,27	0,01
Neuroigin											
P100S	-8,56	-6,37	17,31	5,18	1,25	-3,23	-11,01	-0,51	0,74	-5,22	1,06
D271R	-7,44	-5,76	15,33	4,51	1,27	-3,93	-9,96	-0,48	0,11	-6,37	-0,09
L273E	-7,44	-5,76	15,33	4,55	1,27	-3,91	-9,96	-0,40	0,11	-6,22	0,06
L273G	-7,44	-5,77	15,33	4,54	1,26	-3,92	-9,96	-0,43	0,11	-6,29	-0,01
H294V	-7,44	-5,68	15,36	4,64	1,28	-3,98	-9,78	-0,48	0,11	-5,97	0,31
L399A+N400A+D402N	-5,28	-4,88	11,01	4,18	1,33	-4,17	-8,43	-0,41	0,11	-6,53	-0,25
L399A+N400A+D402N+E297A+K306A	-4,12	-4,51	9,53	3,55	1,34	-4,17	-7,78	-0,30	0,11	-6,36	-0,08
L399A+N400A+D402N+Q395A+E397A	-2,33	-4,00	7,54	2,89	1,33	-4,18	-6,95	-0,29	0,08	-5,91	0,37
L399S	-6,90	-5,37	14,27	4,24	1,30	-4,12	-9,00	-0,41	0,11	-5,89	0,39
R473C	-7,44	-5,76	15,33	4,54	1,26	-3,92	-9,96	-0,42	0,11	-6,28	0,00
R473T	-7,44	-5,76	15,33	4,54	1,26	-3,92	-9,96	-0,42	0,11	-6,28	0,00

Tabelle 8-3. Kalkulierte Bindungsenergien von Wildtyp und Alanin-Mutationen des Neurexin/Neuroigin Komplexes (Alanin-Scan). Diese Daten wurden erhoben, um den energetischen Einfluß der Seitenketten an der Kontaktstelle des Komplex zu bestimmen ohne neue sterische Blockaden einzuführen. Reste, die $\Delta\Delta G$ um mehr als 1 kcal/mol reduziert haben, wurden als *hot spots* deklariert (Abb. 3-13). Die Daten wurden mit dem Program FoldX (<http://foldx.crg.es/>) unter Verwendung der Koordinaten 3b3q aus der Protein Datenbank (PDB) berechnet. Abkürzungen der Energierterme: hb = Wasserstoffbrücken-, vw = vanderWaals-, pol = polare-, sc = Seitenketten-, mc = Hauptketten, wtbr = Wasserbrücken-, hyd = hydrophobe-, el = elektrostatische Wechselwirkungen, vwcl = vanderWaals Überlappung, ene = totale freie Energie ΔG .

	Energy terms										$\Delta\Delta G$
	hb	vw	pol	sc	mc	wtbr	hyd	el	vwcl	ene	
Nrxn/Nlgn complex											
Wild Type	-5,96	-6,83	13,20	5,15	1,09	-1,44	-12,18	-0,74	0,38	-7,30	0,00
Neurexin											
N103A	-5,96	-6,83	13,18	5,14	1,11	-1,44	-12,21	-0,74	0,38	-7,37	-0,07
D104A	-5,96	-6,82	13,14	5,11	1,09	-1,43	-12,18	-0,77	0,38	-7,45	-0,15
R105A	-5,96	-6,84	13,18	5,19	1,09	-1,42	-12,18	-0,76	0,38	-7,31	-0,01
P106A	-5,96	-6,81	13,38	5,15	1,11	-1,43	-12,14	-0,74	0,38	-7,06	0,24
S107A	-5,96	-6,66	12,48	5,14	1,12	-1,88	-12,10	-0,74	0,38	-8,20	-0,90
T108A	-5,96	-6,83	13,27	5,15	1,15	-1,44	-12,18	-0,75	0,38	-7,20	0,10
R109A	-5,36	-6,38	12,20	4,06	1,07	-1,45	-11,35	-0,18	0,00	-7,38	-0,08
R112A	-5,96	-6,82	13,21	5,10	1,09	-1,44	-12,17	-0,64	0,38	-7,24	0,06
T119A	-5,96	-6,83	13,21	5,16	1,09	-1,44	-12,18	-0,74	0,38	-7,29	0,01
V120A	-5,96	-6,83	13,20	5,15	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,30	0,00
Q121A	-5,96	-6,83	13,20	5,15	1,08	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,29	0,01
K122A	-5,96	-6,83	13,21	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,29	0,01
S132A	-5,96	-6,82	13,13	5,16	1,09	-1,43	-12,17	-0,74	0,38	-7,35	-0,05
S133A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,09	-1,42	-12,17	-0,74	0,38	-7,29	0,01
G134A	-5,96	-6,85	13,27	5,16	1,09	-1,44	-12,20	-0,74	0,38	-7,26	0,04
L135A	-5,96	-6,19	12,64	4,87	1,09	-1,43	-10,80	-0,74	0,38	-6,14	1,16
D137A	-8,66	-6,82	14,54	5,66	1,09	-1,87	-12,18	-1,11	0,38	-8,97	-1,67
V154A	-5,96	-6,83	13,21	5,16	1,11	-1,44	-12,17	-0,75	0,38	-7,28	0,02
G155A	-5,96	-6,88	13,35	5,16	1,08	-1,44	-12,25	-0,72	0,62	-7,03	0,27
T156A	-5,96	-6,82	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,15	-0,74	0,38	-7,26	0,04
D157A	-5,96	-6,83	13,21	5,14	1,09	-1,44	-12,17	-0,81	0,38	-7,38	-0,08
D158A	-5,96	-6,83	13,20	5,15	1,09	-1,44	-12,17	-0,78	0,38	-7,35	-0,05
I167A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,73	0,38	-7,30	0,00
I168A	-5,96	-6,82	13,21	5,15	1,09	-1,43	-12,17	-0,73	0,39	-7,30	0,00
N169A	-5,96	-6,83	13,21	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,30	0,00
D170A	-5,96	-6,83	13,21	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,73	0,38	-7,29	0,01
T179A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,73	0,38	-7,28	0,02
N184A	-5,96	-6,82	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,30	0,00
D190A	-5,96	-6,83	13,21	5,14	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,31	-0,01
S191A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,29	0,01
W192A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,73	0,38	-7,29	0,01
P193A	-5,96	-6,83	13,20	5,15	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,30	0,00
R232A	-5,36	-6,68	12,61	4,70	1,09	-1,44	-11,98	-0,24	0,38	-6,91	0,39
Q233A	-5,96	-6,83	13,19	5,15	1,11	-1,44	-12,18	-0,74	0,38	-7,30	0,00
L234A	-5,96	-6,29	12,86	4,75	1,10	-1,44	-10,91	-0,75	0,38	-6,24	1,06
T235A	-5,96	-6,69	12,78	5,07	1,12	-1,44	-12,04	-0,75	0,38	-7,51	-0,21
I236A	-5,96	-5,83	12,52	4,67	1,11	-1,43	-10,01	-0,74	0,37	-5,29	2,01
N238A	-7,36	-6,24	12,95	5,11	1,09	-0,38	-11,44	-0,76	0,38	-6,64	0,66
S239A	-5,96	-6,76	12,88	5,04	1,08	-1,43	-12,15	-0,74	0,38	-7,66	-0,36
K248A	-5,96	-6,83	13,21	5,15	1,09	-1,43	-12,17	-0,74	0,38	-7,30	0,00
E249A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,30	0,00
Q250A	-5,96	-6,83	13,21	5,16	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,29	0,01
G251A	-5,96	-6,83	13,20	5,15	1,09	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,29	0,01
Q252A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,09	-1,44	-12,18	-0,74	0,38	-7,30	0,00
Neuroigin											
G500A	-5,96	-7,08	13,43	5,21	1,09	-1,44	-12,71	-0,74	2,63	-5,55	1,75
L399A	-5,96	-6,16	12,58	4,78	1,12	-1,46	-10,75	-0,64	0,35	-6,11	1,19
F499A	-5,96	-6,42	12,89	4,96	1,10	-1,44	-11,24	-0,74	0,38	-6,46	0,84
N400A	-3,36	-6,33	11,83	4,54	1,12	-2,38	-11,53	-0,74	0,38	-6,47	0,83
E397A	-2,41	-5,87	9,15	3,85	1,07	-1,44	-10,58	-0,81	0,38	-6,65	0,65
G396A	-5,96	-6,87	13,31	5,14	1,09	-1,44	-12,29	-0,73	1,07	-6,66	0,64
P502A	-5,96	-6,68	13,02	5,16	1,07	-1,44	-11,88	-0,76	0,38	-7,08	0,22
F398A	-5,96	-6,76	13,16	5,14	1,13	-1,48	-12,08	-0,74	0,38	-7,22	0,08
Q395A	-5,96	-6,62	12,88	4,90	1,10	-1,44	-11,74	-0,73	0,38	-7,23	0,07
P192A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,10	-1,44	-12,18	-0,74	0,38	-7,30	0,00
G266A	-5,96	-6,83	13,20	5,16	1,10	-1,44	-12,17	-0,74	0,38	-7,30	0,00
L273A	-5,96	-6,83	13,20	5,15	1,09	-1,44	-12,18	-0,75	0,37	-7,30	0,00
T569A	-5,96	-6,82	13,20	5,15	1,10	-1,44	-12,18	-0,74	0,38	-7,30	0,00
D387A	-5,36	-6,77	12,75	4,75	1,09	-1,44	-12,13	-0,62	0,38	-7,32	-0,02
D271A	-5,96	-6,83	13,21	5,16	1,10	-1,44	-12,18	-0,82	0,38	-7,37	-0,07
N498A	-5,96	-6,76	13,01	5,10	1,08	-1,44	-12,07	-0,74	0,38	-7,38	-0,08
E297A	-5,36	-6,58	12,29	4,18	1,10	-1,44	-11,75	-0,27	0,34	-7,46	-0,16
H294A	-5,96	-6,31	12,15	4,81	1,10	-1,44	-11,28	-0,57	0,00	-7,48	-0,18
D402A	-5,96	-6,78	12,85	5,14	1,09	-1,44	-12,14	-0,79	0,38	-7,65	-0,35

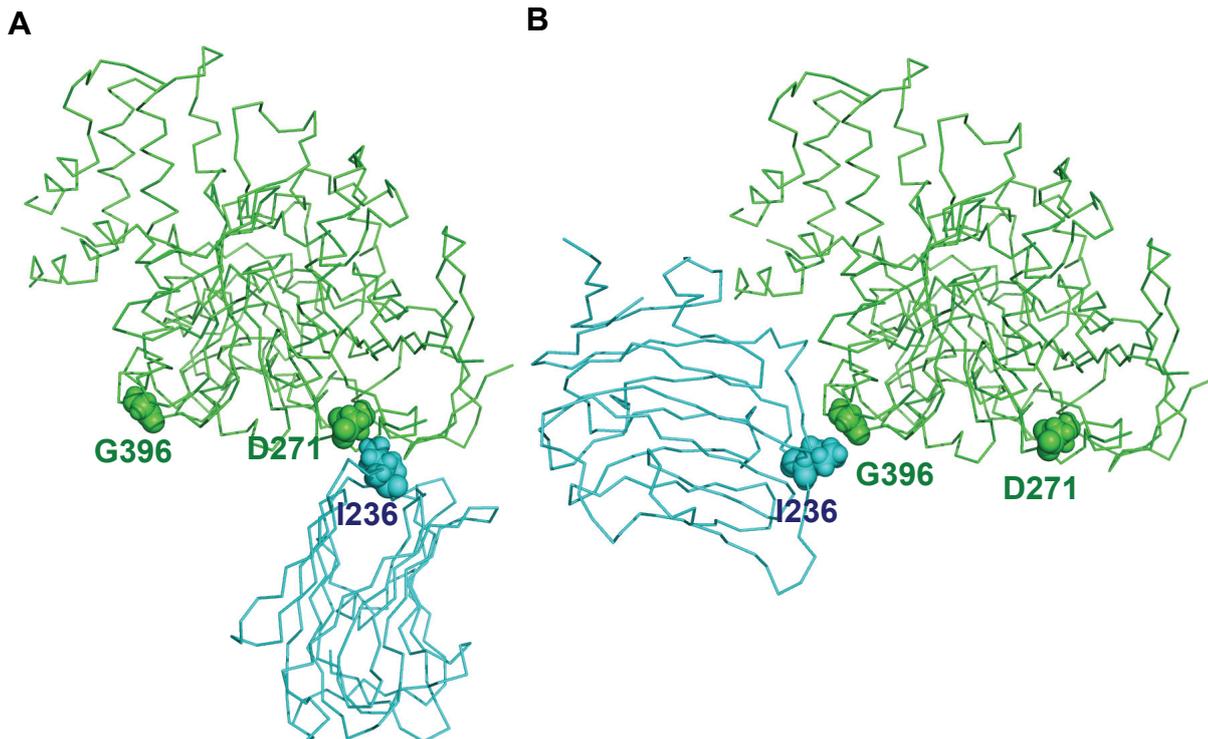


Abb. 8-1. **Erfolgreiche Wiederfindung der Neurexin/Neuroligin Kontaktstelle durch Docking-Verfahren.** Die Koordinaten von Neurexin und Neuroligin des hochaufgelösten Komplex (pdb: 3b3q, Chen et al., 2008) wurden als getrennte Dateien an den 3D Garden Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dgarden/index.cgi>) gesandt und 500 Modellkomplexe erhalten. Auf Position 3 ein Komplex gefunden, bei dem D271 von Neuroligin (grün) das an Neurexin (blau) gebundene Calcium koordinierte (A), während die kristallisierte Kontaktstelle mit G396 im Zentrum auf Position 4 landete (B). Die korrekte Orientierung von beiden Proteinen hatte hingegen keiner der 500 Komplexe.

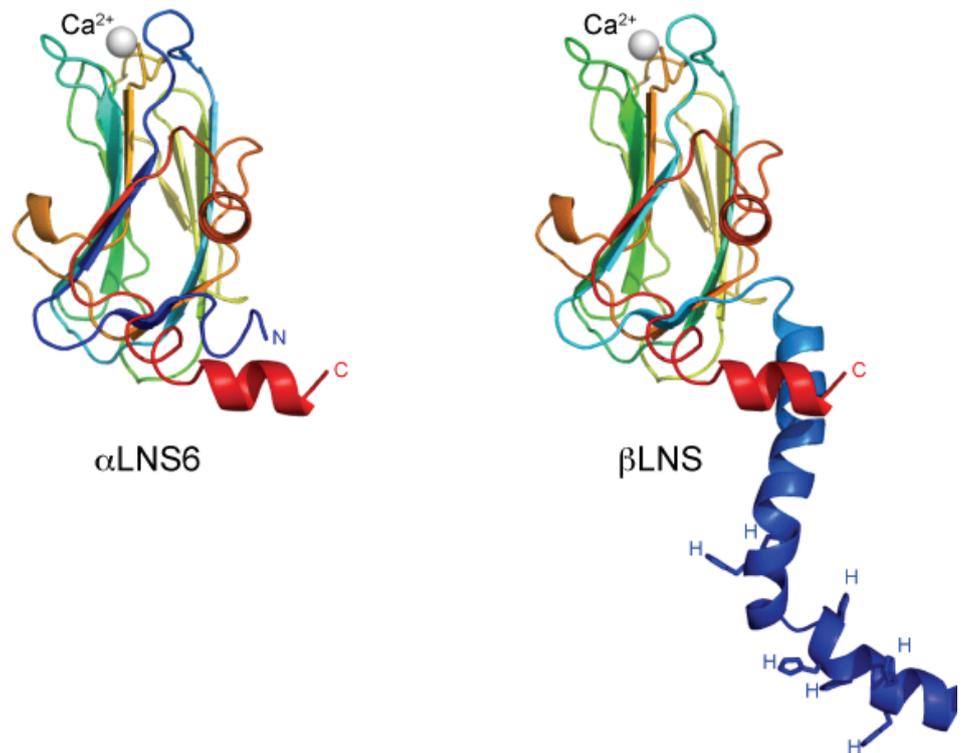


Abb. 8-2. **β -Neurexin besitzt gegenüber α -Neurexin zusätzlich 38 histidin-reiche Reste.** Diese Reste scheinen die isolierte LNS Domäne zu stabilisieren, da die Expression in COS-7 Zellen und die Ausbeute in *pulldown*-Experimenten bei Verwendung von 1β LNS gegenüber 1α LNS6 deutlich größer waren (Abb. 3-6 bis 3-9 und Daten nicht gezeigt).

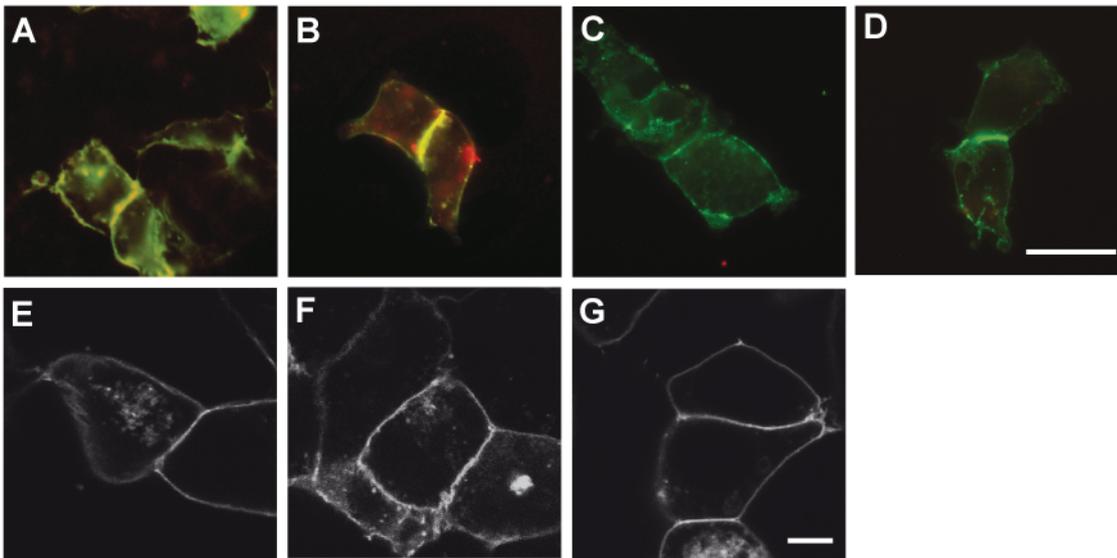


Abb. 8-3. **Zelloberflächenmarkierung von GFP-Neurologin exprimierenden Zellen mit löslichen IgG-LNS Domänen und Oberflächensekretion von mutierten Neurexinen.** (A-D) Neurologin-GFP transfizierte tsA201 Zellen (grün) wurden lebend mit Nrnx-IgG Fusionsproteinen inkubiert (A) Wildtyp β LNS Domäne, (B) T235A Mutation von β LNS, (C) G155V+T156A Mutation von β LNS, und (D) IgG-Kontrolle. Protein A-konjugiert an einen Alexa Fluorophor 546 (rot) wurde benutzt, um die an Neurologin gebundenen Neurexine zu detektieren (gelb bei Überlagerung). (E-G) Autofluoreszenz von intrazellulär EGFP-konjugiertem Nrnx 1 β (IENB) in tsA201 Zellen, (E) Wildtyp IENB, (F) IENB L234S+I236S+N238D Mutation, (G) IENB N238A Mutation. Skalierung (A-D) = 20 μ m; (E-G) = 5 μ m.

Lebenslauf

Name: Carsten Reißner
Geburtstag: 25. Dezember 1964
Geburtsort: Laupheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, 2 Kinder

Bildungsweg

1971-1976
1976-1977
1977-1984
Juni 1984
Grundschule am Kranichdamm, Salzgitter-1
Orientierungsstufe am Sonnenberg, Salzgitter-21
Gymnasium am Fredenberg, Salzgitter-1
Abitur

1984 - 1985
1985 –1992
Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Marine
Studium der Diplom-Biochemie an der Universität
Hannover

1991 –1992
Diplomarbeit am Institut für Klinische Chemie II,
Medizinische Hochschule Hannover

1992 - 1998
Max-Planck-Gesellschaft, Arbeitsgruppen für
Strukturelle Molekularbiologie c/o DESY, Hamburg.
Institut für Mikrobiologie, Johann-Wolfgang-Goethe
Universität Frankfurt/Main

1999 - 2005
Human Science Frontier Program. Leibniz-Institut für
Neurobiologie, Abt. Neurochemie und
Molekularbiologie, Magdeburg

2003 –2005
2005 –2006
Inhaber der Fa. Cortico GbR
DFG-Forschungszentrum Molekularphysiologie des
Gehirns (CMPB) und SFB406. Zentrum Physiologie
und Pathophysiologie, Georg-August Universität
Göttingen

2005 –2006
Doktorand am Institut für Biologie, Abt. Genetik und
Molekulare Neurobiologie, Otto-von-Guericke
Universität Magdeburg

2007
Leibniz-Institut für Neurobiologie, Abt. Neurochemie
und Molekularbiologie, Magdeburg

2007-2008
Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung.
Institut für Anatomie und Molekulare Neurobiologie,
Westfälische-Wilhelms Universität Münster

Münster, den 18.08.2008

.....
Carsten Reißner

Verzeichnis der bisherigen wissenschaftlichen Publikationen:

Referierte Originalarbeiten

Erst- oder gleichwertige Co-Authorenschaft

Gässler N, **Reissner C**, Janzen N, Kahnert H & Kleesiek K. (1993). A high performance liquid chromatography method for the determination of glycosaminoglycans in human blood. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 31(8), 503-511.

Reissner C & Gässler N. (1992). Glykosaminoglykane-Quantitativer Nachweis und Verteilungsmuster in humanem Blut. *Bioforum*, 10, 366-368.

Wu H, **Reissner C**, Kuhlendahl S, Coblenz B, Reuver S, Kindler S, Gundelfinger ED & Garner CC. (2000). Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *Embo J*, 19(21), 5740-5751.

im Druck:

***Reissner C**, Klose M, Fairless R & Missler M. (2008). Mutational analysis of the neurexin/neuroigin complex reveals essential and regulatory components. *Proc Natl Acad Sci USA* 105.

Co-Authorenschaft

*Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, König I, Landwehr M, Kreutz M, Smalla KH, Richter K, Landgraf P, **Reissner C**, Boeckers TM, Zuschratter W, Spilker C, Seidenbecher CI, Garner CC, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (2008). Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol*, 6(2), e34.

Dieterich DC, Landwehr M, **Reissner C**, Smalla KH, Richter K, Wolf G, Bockers TM, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (2003). Gliap--a novel untypical L-asparaginase localized to rat brain astrocytes. *J Neurochem*, 85(5), 1117-1125.

Jose M, Nair DK, **Reissner C**, Hartig R & Zuschratter W. (2007). Photophysics of Clomeleon by FLIM: discriminating excited state reactions along neuronal development. *Biophysical Journal*, 92, 2237-2254.

Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, Kjaergaard S, Mahoney MJ, Morlot S, **Reissner C**, Kerr B, Wilkie AO & Mundlos S. (2007). A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *Am J Hum Genet*, 81(2), 388-396.

Mikhaylova M, Sharma Y, **Reissner C**, Nagel F, Aravind P, Rajini B, Smalla KH, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (2006). Neuronal Ca²⁺ signaling via caldendrin and calneurons. *Biochim Biophys Acta*, 1763(11), 1229-1237.

Seidenbecher CI, Landwehr M, Smalla KH, Kreutz M, Dieterich DC, Zuschratter W, **Reissner C**, Hammarback JA, Bockers TM, Gundelfinger ED & Kreutz MR. (2004). Caldendrin but not calmodulin binds to light chain 3 of MAP1A/B: an association with the microtubule cytoskeleton highlighting exclusive binding partners for neuronal Ca(2+)-sensor proteins. *J Mol Biol*, 336(4), 957-970. (**Titelblatt**)

Seidenbecher CI, **Reissner C** & Kreutz MR. (2002). Caldendrins in the inner retina. *Adv Exp Med Biol*, 514, 451-463.

Buchbeiträge

*Fairless R, **Reissner C** & Missler M. (2006). Role of neuroligin binding to neurexins in synaptic organization. In A El-Husseini & A Dityatev (Hrsg.), *Molecular Mechanisms of Synaptogenesis* (p. 111-124): Springer Verlag.

*Braunewell K-H, **Reissner C** & Gundelfinger ED. (2000). Visinin-like proteins (VILIPs) - Emerging role in cross-talk between cellular signaling pathways. In R Pochet (Hrsg.), *CALCIUM The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine* (p. 197-217). Brussels, Belgium: Kluwer Academic Publishers.

Die mit * gekennzeichneten Artikel wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit publiziert.

Vorträge

Reissner C, Klose M, Fairless R & Missler M. (2007). *The interface of the synaptic neuroligin/neurexin complex essentially depends on hydrophobic interactions*. Society for Neuroscience Meeting, San Diego, USA.

Reissner C. (2004). *Modeling of protein-protein interactions for FRET experiments*. Workshop: Molecular Labeling and FRET Annual Meeting of SSP 1128 Supramolecular Biostructures, Magdeburg.

Reissner C. (2001). *Structural Modeling of SAP97/Calmodulin and Caldendrin complexes*. HFSP Group Meeting, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen.

Reissner C. (2000). *Structural Modeling of Maguks*. ASCB Satellite Meeting of HFSP and NIH, Moscone Center, San Francisco.

Reissner C. (1999). *synProt database / IfN*. Seminar der Bioinformatik, Fakultät für Informatik, Magdeburg.

Reissner C. (1995). *Purification and crystallisation of recombinant proteins from yeast *Sacharomyces cerevisiae**. MERCK Symposium, Hamburg.

Reissner C & Bartunik H-D. (1994). *Determination of the reaction mechanism of yeast hexokinase by X-ray structure analysis*. Seminar für Biologen, Abt. für Biologie, Universität Konstanz.

Reissner C, Beecken V, Jacob L & Bartunik H-D. (1992). *Immobilized metal affinity chromatography of serine proteases*. First FPLC Symposium, Straßbourg.