

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Anatomie und Molekulare Neurobiologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Markus Missler

„Bestimmung wichtiger Bindungseigenschaften des
transsynaptischen Neurexin/Neuroigin-Komplexes
mithilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie“

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Oertel, Michael

aus Oberhausen

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

Referent: Univ.-Prof. Dr. Markus Missler
Koreferent: Prof. Dr. Rupert Hallmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2014

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Anatomie und Molekulare Neurobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Markus Missler
Referent: Univ.-Prof. Dr. Markus Missler
Koreferent: Prof. Dr. Rupert Hallmann**

Zusammenfassung

„Bestimmung wichtiger Bindungseigenschaften des transsynaptischen Neurexin/Neurologin-Komplexes mithilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie“

von Oertel, Michael

Das Zentralnervensystem bildet ein komplexes Netzwerk aus Neuronen, die an den Synapsen miteinander kommunizieren. Eine typische chemische Synapse besteht aus einem prä- und einem postsynaptischen Kompartiment, zwischen denen sich der synaptische Spalt befindet. Am präsynaptischen Neuron kommt das Adhäsionsprotein Neurexin vor, während am postsynaptischen Neuron das Adhäsionsprotein Neurologin zu finden ist. Mithilfe ihrer N-Termini treten Neurexin und Neurologin über den synaptischen Spalt hinweg miteinander in Interaktion und bilden einen Komplex aus einem Neurologin-Dimer und zwei Neurexin-Monomeren. Dieser Komplex besitzt lebenswichtige Funktionen, da Mäuse, denen einer der beiden Bindungspartner fehlt, sterben. Des Weiteren wurden Mutationen in Neurexin und Neurologin bei einigen Patienten mit Autismus und Schizophrenie nachgewiesen, sodass ein Bezug zur klinischen Medizin besteht.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Interaktion der beiden Bindungspartner unter Verwendung der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie, einer optischen Messmethode, die sowohl quantitative als auch qualitative Daten über Affinität und Kinetik in Echtzeit liefert. Zur Durchführung der Experimente wurde ein eigenes Protokoll etabliert, das spezifische Messungen mit einem Spektrometer der Fa. Reichert ermöglicht. Vor- und Nachteile dieser Methodik werden im Diskussionskapitel erörtert.

Bei den durchgeführten Experimenten konzentrierte ich mich auf die Auswirkungen einer spezifischen Sequenz aus 37 Aminosäuren in β -Neurexin, einer extrazellulär kürzeren Variante dieser synaptischen Zelloberflächenmoleküle. Diese, bisher kaum charakterisierte Abfolge, sollte nach einer Modellvorstellung die Bindung an Neurologin vermitteln. Es zeigt sich, dass die 37 Aminosäuren eine, bisher nicht beschriebene, inhibitorische Wirkung auf die Bildung des Neurexin/Neurologin-Komplexes haben. Nach erfolgter Bindung stabilisieren sie den Komplex und verursachen eine langsame Dissoziation. Die Diskussion vergleicht die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse mit Referenzarbeiten und stellt methodische Unterschiede heraus. Zudem präsentiere ich ein Bindungsmodell, das eine mögliche Erklärung für die Wirkung der β -spezifischen Sequenz liefert.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2014

Summary

The central nervous system constitutes a complex network of neurons communicating with each other at chemical synapses. A typical synapse consists of a presynaptic and postsynaptic neuron with the synaptic cleft in between. At the presynaptic compartment, the adhesion protein neurexin may be found whereas the adhesion protein neuroligin is localized at the postsynaptic compartment. Via their N-termini, neurexin and neuroligin interact with each other across the synaptic cleft forming a complex of a neuroligin-dimer and two neurexin monomers. This complex is vitally important as mice, lacking one of the two binding partners, die prematurely. In addition to that, mutations in neurexin and neuroligin have recently been discovered in the genome of patients with autism or schizophrenia, emphasizing their importance to clinical medicine.

The present thesis investigates the interaction of the two binding partners with surface plasmon resonance technology, an optical method that allows to measure qualitative as well as quantitative data of affinity and kinetics in real-time. For the experiments to be performed, a novel protocol has been established, allowing specific affinity measurements with a spectrometer of Reichert Incorporation. Advantages and disadvantages of this technology are considered in the discussion chapter.

In this thesis, I concentrate on the implications of a specific sequence of 37 amino acids in β -neurexin, the extracellularly smaller variant. This sequence has been hardly characterized yet and has been considered to be essential for the binding to neuroligin. Remarkably, the 37 amino acids exhibit a previously unknown inhibitory impact on the formation of the neurexin/neuroligin complex. After the constitution of the complex, the sequence stabilizes it, causing a slow dissociation. The discussion compares the result of the thesis with reference literature and points out methodical differences. Furthermore, I present a binding model as a possible explanation for the effect of the β -specific sequence.

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**„Bestimmung wichtiger Bindungseigenschaften des transsynaptischen
Neurexin/Neurologin-Komplexes mithilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie“**

im Institut für Anatomie und Molekulare Neurobiologie

unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. med. Markus Missler

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 09.11.2014

Michael Oertel

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die chemische Synapse.....	1
1.2	Synaptische Adhäsion	3
1.3	Nrxn als Organisatoren der Präsynapse	4
1.4	Nlgn als Organisatoren der Postsynapse	9
1.5	Nrxn und Nlgn als Kandidatengene für psychiatrische Krankheiten.....	12
1.6	Der transsynaptische Nrxn/Nlgn-Komplex.....	14
1.7	SPR-Technologie als Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen.....	15
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Abkürzungen.....	21
2.2	Geräte	23
2.3	Chemikalien	26
2.4	Bakterienstämme.....	29
2.5	Zellkulturmedien und antibiotische Zusätze	29
2.6	Zellkulturen.....	29
2.7	Vektoren	29
2.8	Zellbiologische Methoden	30
	2.8.1 Transfektion von HEK293-Zellen	31
2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	31
	2.9.1 Äquilibrierung der Protein A beads.....	32
	2.9.2 Bindung der IgG Fusionsproteine an Protein A beads	32
	2.9.3 Elution der IgG-Fusionsproteine von Protein A beads.....	32
	2.9.4 Aufkonzentration mit Amicon Ultra-4 Zentrifugen Filter	33
	2.9.5 Aufkonzentration mit UPPA-Protein Konzentrations-Kit	33
	2.9.6 Aufkonzentration mit Zeba Entsalzungs-Zentrifugen-Säule	34

2.9.7	Aufkonzentration mit PIERCE Konzentrator PES, 3k (88512).....	35
2.9.8	Pufferwechsel mit PUR-A-Lyzer (Fa. Sigma Aldrich)	35
2.9.9	Aufbereitung von NlgnΔB mit Proteaseschnittstelle	35
2.9.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	36
2.9.11	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.10	Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Messungen	37
2.10.1	Physikalische Grundlagen der SPR	37
2.10.2	Ablauf der SPR-Messung	39
2.10.3	Experimentelles Design der SPR-Messung	40
2.10.4	Auswertung der Messdaten.....	41
2.11	Molekularbiologische Methoden	41
2.11.1	Vorbereitung der kompetenten Zellen.....	41
2.11.2	Elektrotransformation	42
2.11.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA („Maxi-Prep“)	42
2.11.4	Agarose-Gelelektrophorese	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Aufreinigung der Nrnx- und Nlgn-Konstrukte	44
3.2	Spezifität des Bindungsassays	47
3.3	Die LNS6 bindet spezifisch und hochaffin an NlgnΔB	52
3.4	Die β-spezifische Sequenz behindert die Bindung an Nlgn.....	55
3.5	SPR-Messung der α-Nrnx mit Spleißefügung 4 auf einem Nlgn-Chip	58
4	Diskussion	62
4.1	Vorteile und Limitationen der SPR-Technologie	62
4.2	Etablierung eines Messprotokolls	64
4.3	Die LNS6 in Interaktion mit NlgnΔB – neue Erkenntnisse über eine bekannte Bindung	70
4.4	Die β-spezifische Sequenz	71
4.5	α-Nrnx – Limitationen und Perspektiven des Bindungsassays	78
5	Ausblick	80

Widmung	81
Danksagung	82
Literatur	84

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	<i>Die chemische Synapse am Beispiel einer GABAergen Synapse</i>	2
Abb. 2:	<i>Intron-/Exonstruktur des Nrnx1-Gens</i>	5
Abb. 3:	<i>Schematischer Aufbau der α- und β- Nrnx</i>	6
Abb. 4:	<i>Schematischer Aufbau eines Nlgn-Dimer</i>	10
Abb. 5:	<i>Flussschema der SPR-Messung in der Injektionsphase</i>	17
Abb. 6:	<i>Die vier Phasen des SPR-Meßzyklus</i>	18
Abb. 7:	<i>Gesamtübersicht des experimentellen Ablaufs</i>	30
Abb. 8:	<i>Schnittstelle der Protease 3C des HRV</i>	36
Abb. 9a:	<i>Schematische Darstellung der SPR-Messanordnung</i>	38
Abb. 9b:	<i>Prismenoberfläche des SR7000DC mit aufliegendem Messchip</i>	38
Abb. 10:	<i>Kontrolle der Proteinaufbereitung von Nlgn und Nrnx mithilfe der SDS-Gelelektrophorese (Coomassiefärbung)</i>	45
Abb. 11:	<i>Kontrolle der Proteinaufbereitung der Nrnx-Konstrukte mithilfe der SDS-Gelelektrophorese (Coomassiefärbung)</i>	46
Abb. 12:	<i>Kontrolle der Proteinaufbereitung einer α-Nrnx Probe mittels SDS-Gelelektrophorese (Coomassiefärbung)</i>	46
Abb. 13:	<i>Test für die Spezifität des SPR-Bindungsassays</i>	48
Abb. 14:	<i>Test der Spezifität der SPR am Beispiel der Interaktion zwischen Nlgn und Anti-Nlgn-AK</i>	49
Abb. 15:	<i>Test der Spezifität der Interaktion zwischen Nlgn und Anti-Nlgn-AK mittels SPR</i> . 50	
Abb. 16:	<i>Test zur Überprüfung von Störeinflüssen durch Glyzinpuffer und Wasser</i>	51
Abb. 17:	<i>SPR-Bindungsexperiment mit LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 und immobilisiertem NlgnΔB</i>	54
Abb. 18:	<i>SPR-Bindungsexperiment zum Vergleich der LNS6 mit der extrazellulären Domäne von β-Nrnx</i>	57
Abb. 19:	<i>SPR-Messung zwischen α-Nrnx und NlgnΔB</i>	60
Abb. 20:	<i>Alternative Konformationen der β-spezifischen Sequenz</i>	72
Abb. 21:	<i>Tertiärstruktur der LNS6 und des β-Nrnx im Vergleich</i>	73
Abb. 22:	<i>Die β-spezifische Sequenz des Nrnx1β der Ratte</i>	74
Abb. 23:	<i>K_d-Werte der Interaktion zwischen NlgnΔB und der LNS6/β-Nrnx im Vergleich ...</i> 77	

Tabelle 1: Verdünnungen für die einzelnen Injektionen..... 41

Tabelle 2: Übersicht über bisherige Arbeiten mit SPR zum Nrxn/Nlgn-Komplex..... 68-69

1 Einleitung

„What mysterious forces precede the appearance of the processes, promote their growth and branching [...] and finally establish those protoplasmatic kisses which seem to constitute the final ecstasy in an epic love story.“

Ramon y Cajal - Recollections of my life

Aus: Blum, H. E. , Dichgans, J. und Kaminsky W. (Hrsg.): Wachstum und Alter- Von den Chancen und Lasten des Lebenszyklus, Band 14, Publikation der Jung-Stiftung für Wissenschaft und Forschung, Thieme, 2006, S. 23.

Von außen nicht sichtbar enthält das Gehirn eine Vielzahl von Neuronen, deren Anzahl kürzlich auf 86 Mrd. geschätzt wurde (Azevedo et al., 2009). Weiterhin gibt es ebenso viele Zellen nicht-neuronalen Ursprungs (Glia-Zellen), die Gesamtzahl cerebraler Zellen beträgt somit ca. 170 Mrd. (Azevedo et al., 2009). Jedes Neuron besitzt Kontaktstellen (Synapsen) zu mehreren Tausend anderen Neuronen, sodass das Gehirn ein hochkomplexes Netzwerk ist. Die (chemische) Synapse besteht aus einem präsynaptischen und einem postsynaptischen Neuron sowie dem dazwischenliegenden ca. 20-30 nm breiten synaptischen Spalt (Gray, 1959a, b; Palay, 1956).

1.1 Die chemische Synapse

Zunächst erfolgte die Einteilung der Synapsen aufgrund der (Fein-)Morphologie in Typ I und Typ II (Gray, 1959a). Einteilungskriterien sind hierbei die elektronenmikroskopischen Dichten am prä- und postsynaptischen Neuron, die bei Typ I-Synapsen asymmetrisch sind (mit verstärkter postsynaptischer Ausprägung), bei Typ-II Synapsen hingegen auf prä- und postsynaptischer Seite gleich ausgeprägt sind (Gray, 1959a).

Dagegen beruht die aktuelle Einteilung auf funktionellen Parametern, z.B. der Unterscheidung zwischen erregender (exzitatorischer) und hemmender (inhibitorischer) Wirkung. Die wichtigsten Transmitter sind Glutamat an exzitatorischen Synapsen und GABA an inhibitorischen Synapsen. Folglich heißen die Synapsen in Abhängigkeit vom verwendeten Transmitter glutamaterge oder GABAerge Synapsen. Wie vermittelt der Transmitter (s. Abb. 1) eine exzitatorische oder inhibitorische Wirkung? Die Signalübertragung an einer GABAergen Synapse beginnt mit dem Eintreffen eines Aktionspotenzials an der präsynaptischen Endigung. Das Aktionspotenzial depolarisiert die Zellmembran und aktiviert spannungsabhängige

Calciumkanäle. Entsprechend strömen Calciumionen entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle und vermitteln die Fusion membranumhüllter Vesikel mit der Zellmembran. Dies führt zur Freisetzung ihres Inhalts, des Transmitters GABA, in den synaptischen Spalt. Die GABA-Moleküle diffundieren über den Spalt und binden am postsynaptischen Neuron an passende Rezeptoren, bei denen es sich um Chloridkanäle handelt. In reifen Neuronen strömen nach Bindung von GABA Chloridionen in die Zelle (s. Abb. 1) und das elektrische Potenzial des postsynaptischen Neurons nimmt ab (Hyperpolarisation). In unreifen Neuronen ist eine exzitatorische Wirkung bekannt, deren Ursache eine höhere intrazelluläre Chloridkonzentration ist (Li et al., 2003). Entsprechend löst GABA in neonatalen Neuronen des Hippocampus eine Exzitation aus, aber verliert diese Fähigkeit im Laufe der zweiten postnatalen Woche (Ben-Ari et al., 1989).

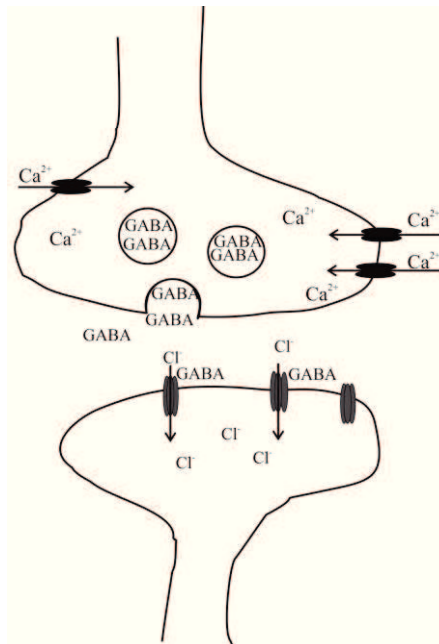


Abb. 1: Die chemische Synapse am Beispiel einer GABAergen Synapse. Präsynaptisches Neuron (oben) mit spannungsabhängigen Calciumkanälen und transmittergefüllten Vesikeln. Postsynaptisches Neuron (unten) mit GABA-Rezeptoren, die bei Aktivierung einen Einstrom von Chloridionen ermöglichen. Abbildung modifiziert nach (Kahle, 2005). Zum genaueren Ablauf s. Text.

Ein analoges Funktionsprinzip ist an glutamatergen Synapsen zu beobachten, jedoch handelt es sich beim synaptischen Transmitter um Glutamat. Für diesen Transmitter existieren zwei Arten von Rezeptoren: 1. der inotrope und 2. der metabotrope Glutamatrezeptor. Der inotrope Rezeptor wiederum umfasst zwei Subtypen, den NMDA- und den AMPA- Rezeptor, die beide

Ionenkanäle sind. Bei einer Aktivierung der inotropen Glutamatrezeptoren resultiert eine Depolarisation der postsynaptischen Membran. Ein einzelnes Neuron erhält aufgrund seiner komplexen Vernetzung von vielen anderen Neuronen gleichzeitig Signale (s.o.), die es am Axonhügel integriert und miteinander verrechnet. Nur bei einer überschwelligem Stimulation entsteht dort ein neues Aktionspotenzial, andernfalls verlischt das Signal („Alles-oder-Nichts-Prinzip“).

1.2 Synaptische Adhäsion

Die beschriebenen physiologischen Vorgänge an der Synapse (s. Abb. 1) erfordern eine präzise Verknüpfung der präsynaptischen Endigung mit einem passenden postsynaptischen Neuron (Yamagata et al., 2003). An der Verbindung zwischen den beiden Neuronen sind Adhäsionsproteine beteiligt; dies sind Proteine in der Zellmembran, die über den synaptischen Spalt hinweg mithilfe ihrer extrazellulären Domänen in Interaktion mit Adhäsionsproteinen der Gegenseite treten (Missler et al., 2012; Piechotta et al., 2006; Shen et al., 2010; Yamagata et al., 2003). Es sind transsynaptische Interaktionen zwischen gleichen Bindungspartnern (homophil) und zwischen unterschiedlichen Proteinen (heterophil) möglich (Missler et al., 2012). Neben der mechanischen Verankerung beteiligen sich Adhäsionsproteine an den wesentlichen Entwicklungsschritten der Synapse (Garrow et al., 2006; Missler et al., 2012; Yamagata et al., 2003). Dazu gehören nach Missler et al.: „1) die Ausbildung des initialen Kontakts, 2) die Organisation prä- und postsynaptischer Strukturen und 3) deren funktionale Spezifikation sowie 4) die synaptische Plastizität“ (Missler et al., 2012).

Die Familien der Cadherine und der Immunglobuline stellen die häufigsten Adhäsionsproteine dar, von denen sich wahrscheinlich an allen Synapsen je mindestens ein Vertreter findet (Yamagata et al., 2003) und die mögliche Kandidaten für die Bildung eines initialen Kontakts zwischen den Neuronen sind (Garrow et al., 2006; Yamagata et al., 2003). Nach der Kontaktbildung erreichen prä- und postsynaptische Proteine die entstehende Synapse und ermöglichen so ihre Funktion (Garrow et al., 2006; Missler et al., 2012; Yamagata et al., 2003). Bei diesem Entwicklungsschritt wirken Adhäsionsproteine wie SynCAM, *leucin-rich-repeat-transmembrane proteins* (LRRTM) und Neurexin (Nrxn) sowie Neuroligin (Nlgn) mit (Garrow et al., 2006; Yamagata et al., 2003). Ebenso kann über die Adhäsion auch die Elimination der Synapse vermittelt werden, unterstützt durch mögliche weitere Abbausignale, wie eine fehlende synaptische Aktivität der Neurone oder das Vorhandensein von Eliminationsfaktoren (Benson et al., 2001; Garrow et al., 2006). Zudem unterliegt das Vorkommen der Adhäsionsproteine an der sich entwickelnden Synapse einer funktionellen Anpassung: Das homophile Adhäsionsprotein der N-Cadherine kommt zunächst gleichmäßig an neugebildeten Synapsen des Hippocampus

vor und beschränkt sich später in der Entwicklung auf einige Ansammlungen (Elste et al., 2006).

Neben den erwähnten homophilen Adhäsionskomplexen erfordert das Vorhandensein unterschiedlicher Proteine am prä- und postsynaptischen Neuron heterophile Adhäsionskomplexe (Brose, 1999), zu denen der Komplex der Proteine Nrnx und Nlgn gehört (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996; Nguyen et al., 1997).

1.3 Nrnx als Organisatoren der Präsynapse

Die Nrnx wurden Anfang der 90er Jahre als Rezeptoren für α -Latrotoxin entdeckt, einen Bestandteil des Giftes von Spinnen aus der Gattung *Latrodectus* (Ushkaryov et al., 1992). Insgesamt besteht die Familie bei Vertebraten aus drei Genen, die jeweils für ein längeres α -Nrnx und für ein kürzeres β -Nrnx kodieren (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov et al., 1993; Ushkaryov et al., 1994). Nrnx sind überwiegend neuronale Proteine und konnten im zentralen (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov et al., 1993) und enterischen Nervensystem (Zhang et al., 2013) nachgewiesen werden. Sie kommen zusätzlich in sekretorischen Zellen des Pancreas (Mosedale et al., 2012; Suckow et al., 2008) und des vorderen Lappens der Hypophyse (Dudanova et al., 2006) sowie im Gefäßsystem (Bottos et al., 2009) vor. Innerhalb des Gehirns besitzen die Nrnx definierte, teilweise überlappende Verteilungsgebiete (Ullrich et al., 1995). Diese distinkte Verteilung sowie die große Vielfalt der Adhäsionsproteine führte Ushkaryov et al. zu der Vermutung, dass sich Neurone mithilfe ihres typischen Nrnx-Musters in der Synaptogenese spezifisch erkennen (Ullrich et al., 1995; Ushkaryov et al., 1992).

Die Diversität der Nrnx entsteht ausgehend von drei Genen, die sich beim Menschen auf den Chromosomen 2p16 (*nrnx1*), 11q12 (*nrnx2*) sowie 14q32 (*nrnx3*) befinden (Tabuchi et al., 2002). Das Gen für Nrnx1 (s. Abb. 2) besitzt eine Länge von 1,1 Mbp und ist damit sehr groß (Rowen et al., 2002; Tabuchi et al., 2002). Bei allen Nrnx-Genen wird die Expression über zwei Promotoren gesteuert, die sich am Beginn des Gens (α -*nrnx*) und zwischen Exon 17 und 18 befinden (β -*nrnx*), sodass zwei mRNA-Transkripte entstehen (Rowen et al., 2002; Tabuchi et al., 2002). Insgesamt verfügt das Gen für Nrnx1 α über 24 Exone, von denen die Exone 18-24 auch für β -*nrnx* kodieren (Rowen et al., 2002; Tabuchi et al., 2002). Darüber hinaus besitzt β -*nrnx* ein exklusives Exon (β 1), in dem sich das Startcodon befindet (Rowen et al., 2002). Die Vermutung, dass Invertebraten aufgrund eines fehlenden Promoters kein β -Nrnx erzeugen können (Tabuchi et al., 2002), wurde durch den Nachweis von β -*nrnx*-Transkripten in *Caenorhabditis elegans* relativiert (Haklai-Topper et al., 2011). Allerdings verfügen Invertebraten lediglich über ein Nrnx-Gen statt drei (Tabuchi et al., 2002). Eine mögliche Erklärung hierfür liefert ein Modell, nach dem zu Beginn der Evolution der Proteinfamilie nur

ein singuläres, archetypisches (α -)Nrnx existierte (Missler et al., 1998a). Später entstand schrittweise durch Einfügen eines zusätzlichen Promoters für β -Nrnx und Duplikation in drei Gene die heutige Diversität (Missler et al., 1998a).

Die Transkripte für α - und β -Nrnx unterliegen nachfolgend einem ausgeprägten alternativen Spleißen, das für die α -Isoformen an den konsekutiv nummerierten Spleißstellen 1-5 (*splice site*, SS) stattfindet, die teilweise (SS#4 und #5) auch in β -Nrnx vorliegen (Rowen et al., 2002; Tabuchi et al., 2002). Das Spleißen an den einzelnen Stellen erfolgt unabhängig voneinander (Ullrich et al., 1995), sodass unter Berücksichtigung aller Kombinationen aus drei Nrnx-Genen über 2000 verschiedene mRNA entstehen können (Rowen et al., 2002; Tabuchi et al., 2002).

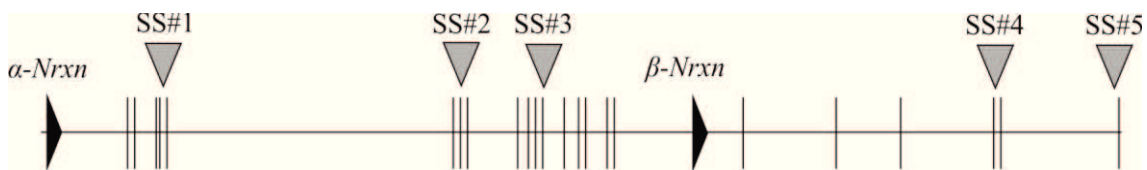


Abb. 2: Intron-/Exonstruktur des Nrnx1-Gens. Die Exone werden als vertikale Balken dargestellt, die Introns bilden die dazwischenliegenden Abschnitte. Die beiden schwarzen Dreiecke zeigen die Lage der Promotoren für α - bzw. β -Nrnx an und die Spleißstellen sind mit vertikalen grauen Pfeilen markiert. Abbildung modifiziert nach (Reissner et al., 2013; Runkel et al., 2013).

Auf Ebene der Proteine gehören sowohl α - als auch β -Nrnx zu den Typ-I Transmembranproteinen, d.h. ihr N-Terminus ist in den synaptischen Spalt gerichtet (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov et al., 1993; Ushkaryov et al., 1994). Alle drei α -Nrnx besitzen extrazellulär den gleichen Aufbau (s. Abb. 3) aus der dreimaligen Wiederholung einer Kassettenstruktur von zwei Laminin-Neurexin-Sexual-Hormon-Bindendes-Globulin (LNS)-Domänen und einer dazwischengelagerten EGF-ähnlichen Domäne (*epidermal growth factor-like*) (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov et al., 1993). Strukturell ähnelt die extrazelluläre Sequenz einem L mit einer flexiblen Scharnierregion zwischen LNS5 und EGF3, mit deren Hilfe verschiedene Konfigurationen des Nrnx im synaptischen Spalt möglich sind (Chen et al., 2011; Miller et al., 2011). Die LNS-Domänen sind kein Alleinstellungsmerkmal der Nrnx, sondern sind auch Bestandteil von Proteinen der extrazellulären Zytomatrix, von Serumproteinen und von Zelloberflächenrezeptoren (Missler et al., 1998c). Im β -Nrnx (s. Abb. 3) fehlt im Unterschied zum α -Nrnx die Kassettenwiederholung, stattdessen besteht der N-Terminus aus einem atypischen Signalpeptid, einer β -spezifischen Sequenz sowie einer einzelnen LNS-Domäne, die identisch mit der sechsten LNS des α -Nrnx ist (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov et al., 1994). Sie enthält eine α -Helix und 14 β -Stränge, die in zwei antiparallelen

großen Blättern zu je sieben β -Faltblättern angeordnet sind und entsprechend ihrer Nummerierung einzeln miteinander verbunden sind (Rudenko et al., 1999). Die Struktur ist konkav-konvex geformt und besitzt auf der konkaven Seite eine Kavität, deren Begrenzung die Verbindungsstränge zwischen β -4 und β -5 (unten), sowie β -11 und β -12 (oben) sind (Rudenko et al., 1999). Insgesamt hat die LNS6 bzw. β -LNS eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Lectinen oder Lectin-artigen Domänen, sodass Nrnxn möglicherweise, analog zu diesen Molekülen, Zucker binden kann (Rudenko et al., 1999). An die letzte LNS-Domäne schließt sich für α - und β -Nrnxn eine serin- und threoninreiche Sequenz mit O-Glykosylierungen an, gefolgt von einer einzelnen Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Schwanz (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov et al., 1993; Ushkaryov et al., 1994) mit einem PDZ-Bindungsmotiv, das den korrekten Transport der Nrnxn an die Zelloberfläche ermöglicht (Fairless et al., 2008).

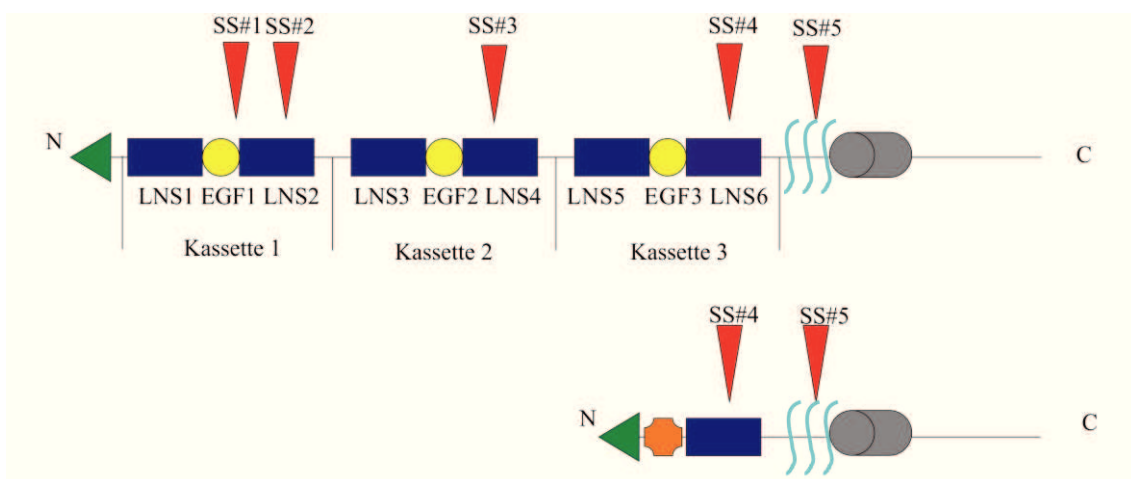


Abb. 3: Schematischer Aufbau der α - und β -Nrnxn. Sowohl α -(oben) als auch β -Nrnxn (unten) gehören zu den Typ-I-Transmembranproteinen, weisen jedoch strukturelle Unterschiede auf. Signalpeptid (grün), β -spezifische Sequenz (orange), LNS-Domäne (dunkelblau), EGF-Domäne (gelb), glykosylierte Sequenz (hellblau) Transmembrandomäne (grau). Die SS sind konsekutiv mit 1-5 (α -Nrnxn) bzw. 4-5 (β -Nrnxn) nummeriert und mit roten Pfeilen oberhalb der Nrnxn gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach (Missler et al., 1998c; Reissner et al., 2008; Südhof, 2008).

Weiterhin binden Nrnxn über das PDZ-Bindungsmotiv an das intrazelluläre Protein CASK, das über die Proteine Mint1 und Veli mit Proteinen der Vesikelexozytose in Verbindung steht (Butz et al., 1998; Hata et al., 1996). CASK wiederum koppelt an N-Typ Calciumkanäle und Mint interagiert mit N-Typ sowie Q-Typ Calciumkanälen (Maximov et al., 1999), durch die Ionen in die aktivierte Präsynapse einströmen können (Wheeler et al., 1994). Insofern etablieren diese Interaktionen eine Verknüpfung zwischen Nrnxn und Strukturen, die für die präsynaptische

Funktion erforderlich sind (Butz et al., 1998; Hata et al., 1996; Maximov et al., 1999). Allerdings stellt dieser Komplex nicht die einzige präsynaptische Organisationseinheit dar: So führte ein knock-out von CASK in Neuronen nicht zu einer Änderung der synaptischen Struktur und beeinflusste nur die basale Freisetzung von Neurotransmittern, nicht aber die aktivitätsvermittelte Ausschüttung (Atasoy et al., 2007). Hierzu korrespondiert, dass ein knock down von Mint1, dem einzigen Mitglied der Mint-Familie, das mit CASK interagiert, nur Einfluss auf die GABAerge Signalübermittlung hatte (Ho et al., 2003).

Auch extrazellulär kann Nrnx in Interaktion mit einem Repertoire unterschiedlicher Proteine treten wie Nlgn (Ichtchenko et al., 1995), Neurexophilinen (Missler et al., 1998b; Petrenko et al., 1996), α - und β -Dystroglycan (Sugita et al., 2001), Glutamatrezeptoren über Cbln1 (Uemura et al., 2010), GABA_A-Rezeptoren (Zhang et al., 2010), LRRTM (de Wit et al., 2009; Ko et al., 2009) und Calsyntenin-3 (Pettem et al., 2013). Obwohl die Nrnx aufgrund ihrer Bindung an α -Latrotoxin entdeckt wurden (s. o.), steht dies nicht mehr im Vordergrund der Forschung, da Nrnx an der Wirkung des Toxins, der Freisetzung von Neurotransmittern, nur in Anwesenheit von Calcium beteiligt sind (Geppert et al., 1998; Sugita et al., 1999; Ushkaryov et al., 1992).

Interessanterweise beeinflussen Nrnx aber über ihre Bindungspartner die funktionelle Differenzierung der Synapse und greifen in das präzise Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition ein: Einerseits regulierten Nrnx über eine direkte Bindung an GABA_A-Rezeptoren die inhibitorische Signalübertragung herunter (Zhang et al., 2010). Andererseits können alle Nrnx ohne Spleißeinfügung 4 calciumabhängig an LRRTM1 und 2 binden (Siddiqui et al., 2010) und verstärken so die Exzitation an der Synapse (de Wit et al., 2009; Ko et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit der Regulation entsteht durch das Koppeln von β -Nrnx sowie Nrnx1 α , jeweils mit Spleißeinfügung 4, an Glutamatrezeptoren vom Typ Δ 2 über das Protein Cbln1. Diese Interaktion etabliert eine transsynaptische Verknüpfung und ermöglicht die Ausbildung von Synapsen in vitro und in vivo im Cerebellum (Matsuda et al., 2011; Uemura et al., 2010). Der hierfür notwendige Komplex besteht aus 4 β -Nrnx Monomeren, 2 Cbln1 Hexameren und einem Rezeptortetramer (Lee et al., 2012). Er zeichnet sich gegenüber den Interaktionen mit Nlgn und LRRTM durch seine Beständigkeit auch bei niedrigen Calciumkonzentrationen aus (Matsuda et al., 2011; Uemura et al., 2010).

Die einzelnen Interaktionspartner stehen miteinander im Wettstreit um die Bindung an Nrnx. Entsprechend verhinderte ein rekombinantes Cbln1 effektiv die Komplexbildung zwischen Nrnx und Nlgn (Matsuda et al., 2011). Zudem konkurrieren LRRTM und Nlgn um eine größtenteils identische Stelle an Nrnx, sodass jeweils nur eines der beiden Moleküle binden kann (Ko et al., 2009; Siddiqui et al., 2010). Interessanterweise vermitteln Nlgn und LRRTM in vivo sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Funktionen: Ein knock-down der LRRTM1

und 2 am ersten Lebenstag erzeugte im Maus-Modell eine Abnahme der erregenden Ströme durch AMPA-Kanäle, während ein knock-down von Nl1 und 3 keine Auswirkungen auf die Exzitation an der Synapse hatte (Soler-Llavina et al., 2011). Gleichzeitig besitzen die Proteine in diesem Stadium synergistische Funktionen, da sich bei einem Ausschalten von LRRTM1/2 sowie Nlgn1/3 zusätzlich Defekte der NMDA- und AMPA-Ströme zeigten (Soler-Llavina et al., 2011). Dagegen verminderte in reifen Neuronen der Nl1 knock-down das Verhältnis von NMDA/AMPA-Strömen und ein Ausschalten der LRRTM verursachte keine Unterschiede gegenüber dem Wildtyp (Soler-Llavina et al., 2011). Insgesamt weisen die Interaktionsstudien auf eine regulative Funktion der Nrnx und ihrer Interaktionspartner sowohl an exzitatorischen als auch an inhibitorischen Synapsen hin, die in vivo und in vitro Studien weiter untersucht wurde.

Im Bezug auf die Funktion der Nrnx existieren zwei verschiedene Modelle: a) Nrnx sind synaptogenetisch und lösen die Bildung von Synapsen aus (Graf et al., 2004) oder b) Nrnx sind für die Bildung der Synapsen entbehrlich, aber für ihre Funktion erforderlich (Missler et al., 2003). In Zellkultur-Experimenten zeigte Nrnx1 β eine synaptogenetische Wirkung: Die Überexpression von Nrnx1 β in nichtneuronalen Zellen rekrutierte auf benachbarten hippocampalen Neuronen mithilfe der LNS-Domäne die postsynaptischen Gerüstproteine Gephyrin und PSD-95 sowie Untereinheiten von NMDA- und GABA-Rezeptoren (Graf et al., 2004). Im Unterschied hierzu wiesen α -Nrnx in diesem Assay eine Selektivität für die Ausbildung inhibitorischer Synapsen auf und rekrutierten nur entsprechende postsynaptische Proteine wie Gephyrin und Nlgn2 (Chih et al., 2006; Kang et al., 2008). Experimente in vivo stützen die Bedeutung der α -Nrnx an inhibitorischen Synapsen: α -Nrnx knock-out Mäuse zeigten eine Verminderung der inhibitorischen spontanen und evozierten Signalübertragung (Missler et al., 2003). Der Defektphänotyp dieser Mäuse umfasste weitere Einschränkungen der synaptischen Signalübertragung, deren gemeinsame Grundlage ein Defekt der Ströme durch N-Typ-Calciumkanäle war, wie eine Verminderung der exzitatorischen postsynaptischen Potenziale im Hirnstamm, eine Verminderung der NMDA-vermittelten Potenziale im Neokortex, eine Verminderung der spontanen Vesikelfreisetzungsfrequenz in Hirnstamm und Neokortex sowie eine Erhöhung der Fehlerrate der synaptischen Übertragung im Neokortex (Kattenstroth et al., 2004; Missler et al., 2003). Diese Defekte ließen sich durch das Einbringen eines rekombinanten α -Nrnx-Konstruktes, nicht aber durch β -Nrnx, teilweise kompensieren (Missler et al., 2003; Zhang et al., 2005). Auch in anderen Geweben des menschlichen Körpers wie Muskulatur (Sons et al., 2006) und Inselzellen (Mosedale et al., 2012; Suckow et al., 2008) regulieren Nrnx die Vesikelexozytose, sodass dies eine zentrale Funktion der Proteinfamilie ist. Im Unterschied zu den ausgedehnten funktionellen Defiziten waren die synaptische

Ultrastruktur und die Anzahl exzitatorischer Synapsen in zweifach und dreifach α -knock-out-Mäusen unverändert (Dudanova et al., 2007; Missler et al., 2003). Es lag nur eine Verminderung der Anzahl inhibitorischer Synapsen und eine geringere Differenzierung der dendritischen Bäume vor (Dudanova et al., 2007; Missler et al., 2003). Diese Ergebnisse relativierten die Bedeutung der Nrnx für die Synaptogenese in vivo und zeigten stattdessen regulatorische Funktionen an der Präsynapse auf (Dudanova et al., 2007; Missler et al., 2003). Deswegen sind die Nrnx überlebenswichtige Proteine, da die dreifach knock-out Mäuse nicht lebensfähig waren und am ersten Tag nach der Geburt aufgrund von respiratorischen Problemen in Form einer verlangsamten und abgeflachten Atmung verstarben (Missler et al., 2003).

Darüber hinaus regulieren Nrnx im Tiermodell das Verhalten in verschiedenen Bereichen: Männliche Mäuse mit einem knock-out des Nrnx1 α waren aggressiver gegenüber Artgenossen, aber vermieden angstausslösende Situationen stärker als Mäuse des Wildtyps (Grayton et al., 2013). Andere Beobachtungsstudien konnten kein unterschiedliches Sozialverhalten und keine Änderung der Angst feststellen (Etherton et al., 2009). Übereinstimmend berichten die Arbeiten von Defiziten der Nrnx1 α -knock out Mäuse beim Nestbau (Etherton et al., 2009; Grayton et al., 2013). Im Bezug auf Lernen und Gedächtnis wiesen homozygote Mäuse mit Nrnx1 α -knock out gegenüber dem Wildtyp keine Einschränkungen auf und zeigten ein verbessertes motorisches Lernen (Etherton et al., 2009; Grayton et al., 2013). Auch Ergebnisse mit männlichen heterozygoten knock out-Mäusen des gleichen Gens gaben Hinweise auf eine gesteigerte Lernleistung, da sich diese schneller als Wildtyp-Tiere an eine neue Umgebung gewöhnten und neue Objekte schneller identifizieren konnten (Laarakker et al., 2012).

In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass Nrnx intra- und extrazellulär an verschiedene Proteine binden (s.o.) und daher ein Verständnis der lebenswichtigen Nrnx-Funktion nur unter Berücksichtigung der Bindungspartner erfolgen kann. Im Folgenden konzentriert sich die Betrachtung auf die Proteinfamilie der Nlgn, die erstmals 1995 beschrieben wurde (Ichtchenko et al., 1995).

1.4 Nlgn als Organisatoren der Postsynapse

Die Erstbeschreibung der Nlgn erfolgte aufgrund ihrer Fähigkeit, die LNS von β -Nrnx zu binden (Ichtchenko et al., 1995). Sie bilden eine Proteinfamilie aus 4 Mitgliedern, deren Gene sowohl auf Autosomen (Nlgn1-2) als auch auf Gonosomen (Nlgn3-4) zu finden sind (Bolliger et al., 2001). Auch die Expression der Nlgn konzentriert sich auf das Gehirn (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996). Weiterhin kommen Nlgn in der Retina (Hoon et al., 2011), dem Pancreas (Suckow et al., 2008), dem Gefäßsystem (Bottos et al., 2009), dem enterischen

Nervensystem (Zhang et al., 2013), dem Herz, der Skelettmuskulatur und der Leber vor (Bolliger et al., 2001).

Im strukturellen Vergleich zu den Nrnx finden sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede (s. Abb. 4): Auch die Nlgn gehören zu den Typ-I Transmembranproteinen (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996). Allerdings besteht der extrazelluläre Anteil der Nlgn nahezu vollständig aus einer großen Domäne, die Homologien zur Familie der Esterasen (Esterase-Artige Domäne) aufweist (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996). Im Unterschied zu den Proteinen dieser Familie ist die Esterase-Artige Domäne der Nlgn durch eine Aminosäuresubstitution von Ser zu Gly im aktiven Zentrum funktionell inaktiv (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996). Innerhalb dieser Domäne dimerisiert Nlgn über die Zusammenlagerung von je zwei Helices aus jedem Protomer, die über größtenteils hydrophobe Bindungen interagieren (Araç et al., 2007; Fabrichny et al., 2007). Neben der Bildung homogener Dimere ist auch die Dimerisierung unterschiedlicher Mitglieder der Nlgn-Familie möglich (Poulopoulos et al., 2012). An die Esterase-Domäne schließt sich eine relativ starre serin- und threoninreiche Domäne mit zahlreichen Glykosylierungen an, die den N-Terminus in den synaptischen Spalt auslenkt (Comoletti et al., 2007; Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996). Hierauf folgt eine einzelne Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatische Schwanz (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996).

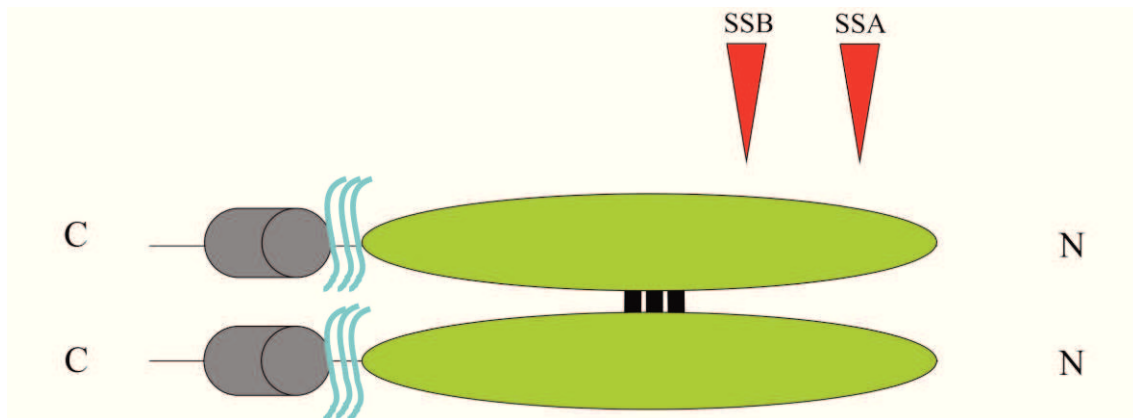


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines Nlgn-Dimer. Esterase-Artige Domäne (hellgrün), glykosylierte Sequenz (hellblau), Transmembrandomäne (grau) und C-Terminus. SSA und SSB in der Esterase-Artigen Domäne sind mit roten Pfeilen über Nlgn gekennzeichnet und die Dimerisierung wird durch schwarze Balken zwischen den beiden Molekülen angedeutet. Abbildung modifiziert nach (Missler et al., 1998c; Südhof, 2008).

Im C-Terminus befindet sich ein PDZ-Bindungsmotiv, das die Bindung an eine Vielzahl synaptischer Proteine wie PSD-95, SAP102, Chapsyn 110, S-SCAM, Magi 1 und 3, Shank 1

und 3, Pick1, GOPC, SPAR, Semcap3, PDZ-RSG3 vermittelt (Meyer et al., 2004) und Nlgn damit in die funktionelle Struktur des postsynaptischen Neurons einbindet.

Die *in vitro* und *in vivo* Funktionen der Nlgn zeigen deutliche Parallelen zu den Nrnx: Zellen, die Nlgn exprimierten, induzierten auf benachbarten Neuronen die Ausbildung präsynaptischer Differenzierungen und wiesen daher eine synaptogenetische Wirkung auf (Chubykin et al., 2005; Chubykin et al., 2007; Graf et al., 2004; Prange et al., 2004; Scheiffele et al., 2000). Hierbei zeigte sich, dass alle Nlgn in einer neuronalen Kultur sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Synapsen bilden konnten (Chih et al., 2005). Umgekehrt führte ein knock-down der Nlgn1-3 zu einer Abnahme der Anzahl inhibitorischer Synapsen (Chih et al., 2005). Einen weiteren Beleg für die Mitwirkung der Nlgn bei der Synaptogenese lieferte ein transgenes Nlgn1-Mausmodell, das eine Erhöhung der Anzahl exzitatorischer Synapsen und eine erhöhte Expression synaptischer Proteine aufwies (Dahlhaus et al., 2010).

Dagegen widersprachen Untersuchungen in einem Mausmodell mit knock-out der Nlgn1-3 einer ausschließlichen Rolle in der Synapsenbildung, da die Gesamtzahl der Synapsen unverändert war (Varoqueaux et al., 2006). Entsprechend folgerten die Autoren, dass Nlgn die Synapsenbildung auslösen können, aber nicht zwangsläufig erforderlich sind („*sufficient, not necessary*“) (Varoqueaux et al., 2006). Andererseits verursachte der dreifach knock-out der Nlgn eine deutliche Schädigung der synaptischen Übertragung mit einer Verminderung der spontanen Vesikelfreisetzungsfrequenz an glyzineren, glutamatergen und GABAergen Synapsen und einer Reduktion der Amplitude evozierter Potentiale an glyzineren und GABAergen Synapsen (Varoqueaux et al., 2006). Die betreffenden Mäuse waren nicht lebensfähig (analog zu den α -Nrnx dreifach knock-out-Mäusen (s.o.)) und starben kurz nach der Geburt (Varoqueaux et al., 2006), während Mäuse mit einem einfachen oder zweifachen Nlgn-knock-out überlebensfähig waren (Song et al., 1999; Varoqueaux et al., 2006). Außerdem wiesen Tierexperimente auf eine Rolle der Nlgn in der Verhaltensregulation hin, denn die zweifach Nlgn-knock out Mäuse besaßen eine verminderte mütterliche Fürsorge (Varoqueaux et al., 2006), die transgenen Nlgn1 Mäuse verfügten über eine verminderte Lernfähigkeit (Dahlhaus et al., 2010) und Mäuse mit Nlgn2 Überexpression zeichneten sich durch eine verminderte Aggressivität aus (Kohl et al., 2013).

Aus funktioneller Sicht fiel auf, dass Nlgn1 selektiv exzitatorische und Nlgn2 selektiv inhibitorische Synapsen beeinflusste (Chubykin et al., 2007). Durch Überexpression von Nlgn1 in einer neuronalen Kultur erhöhten sich die evozierten AMPA- und NMDA- vermittelten Ströme, während eine Überexpression von Nlgn2 die evozierten inhibitorischen Ströme verstärkte (Chubykin et al., 2007). Auch in einer Kultur aus cerebellären Körnerzellen steigerte die Überexpression von Nlgn2 Amplitude und Frequenz spontaner inhibitorischer Ströme (Fu et

al., 2009). Umgekehrt reduzierte das selektive Ausschalten einzelner Nlgn in Knock-out Mäusen die Amplitude der evozierten NMDA-Ströme (Nlgn1) oder die Amplitude spontaner und evozierter inhibitorischer Ströme (Nlgn2) (Chubykin et al., 2007; Gibson et al., 2009). Hierzu korrespondiert nach Chubykin (Chubykin et al., 2007) die überwiegende Lokalisation von Nlgn1 an exzitatorischen Synapsen (Song et al., 1999) und von Nlgn2 an inhibitorischen Synapsen (Chih et al., 2005; Levinson et al., 2010; Varoqueaux et al., 2004). Gleichzeitig modulieren Gerüstproteine der Postsynapse die Lokalisation der Nlgn, wie die beiden Antagonisten PSD-95 an exzitatorischen und Gephyrin an inhibitorischen Synapsen zeigten, die Nlgn an die entsprechende Synapse rekrutierten bzw. dort festhielten (Levinson et al., 2005; Levinson et al., 2010; Prange et al., 2004). Die differenzielle Regulation des Verhältnisses von Exzitation zu Inhibition ist von großem Interesse, da eine Verschiebung dieses Verhältnisses in Richtung Exzitation eine mögliche Ursache psychiatrischer Erkrankungen wie Autismus ist (Rubenstein et al., 2003). Das folgende Kapitel charakterisiert zunächst kurz die psychiatrische Krankheit Autismus, als Beispiel für eine psychiatrische Krankheit mit möglicher Beteiligung der Nrnxn und Nlgn.

1.5 Nrnxn und Nlgn als Kandidatengene für psychiatrische Krankheiten

Eine erste Beschreibung der Krankheit, die heute als Autismus bezeichnet wird, lieferten Leo Kanner und Hans Asperger in zwei Arbeiten, die das Verhalten von vier (Asperger) bzw. elf Kindern (Kanner) mit distinkter Psychopathologie beschrieben (Asperger, 1943; Kanner, 1943). Charakteristisch für diese Kinder war eine extreme autistische Einsamkeit („*extreme autistic aloneness*“; Kanner, 1943), d.h. diese Kinder suchten keinen Kontakt zu Gleichaltrigen, isolierten sich und etablierten keine sozialen Beziehungen zu ihren Mitmenschen (Asperger, 1943; Kanner, 1943). Insofern ist der Begriff des „Autismus“ deskriptiv und weist auf die selbstbezogene Isolation der Betroffenen hin (Dose, 2010). Nach einer aktuellen Definition aus dem diagnostischen und statistischen Manual der amerikanischen psychiatrischen Gesellschaft zeichnet sich der frühkindliche Autismus durch eine Trias aus verzögerter oder gestörter Entwicklung der Kommunikationsfähigkeit und des Sozialverhaltens sowie auf wenige Bereiche eingeschränkte Aktivitäten und Interessen aus (aus der Definition zu „Autistischer Störung“ („*Autistic Disorder*“) der Medical Subject Headings (US National Library of Medicine, 2013)). Mittlerweile versuchen anatomische Untersuchungen den Defiziten des Autismus spezifische neuroanatomische oder funktionelle Besonderheiten zuzuordnen und damit die Krankheit im Gehirn zu verorten. Zusammengefasst ließen sich bei einigen Autisten Veränderungen in Anatomie, Neurotransmittersystemen, Neurotrophinen und der neuronalen Konnektivität nachweisen, die darauf hindeuten, dass diese Krankheit zusammen mit cerebralen

Veränderungen auftritt (Pardo et al., 2007). Außerdem besitzt Autismus eine hohe Erbllichkeit (DiCicco-Bloom et al., 2006; Levy et al., 2009), sodass in den letzten Jahren intensiv nach genetischen Risikofaktoren der Krankheit im Gehirn gesucht wurde. Allerdings entsteht Autismus erst durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Mutationen (Polygenie), was die Identifikation der Kandidatengene erschwert (Muhle et al., 2004). Trotzdem konnten bereits Chromosomenregionen identifiziert werden, in denen bei einigen Autisten Mutationen vorliegen (Muhle et al., 2004). Eine im Rahmen dieser Arbeit interessante Region ist Xq13-q21, da sich auf dem X-Chromosom Nlgn-Gene befinden (Muhle et al., 2004).

Die vorgestellten synaptischen Adhäsionsmoleküle Nrnx und Nlgn sind somit auch aus medizinischer Sicht von Bedeutung: Es fanden sich Mutationen in Nlgn3, Nlgn4, Nrnx1 α und Nrnx1 β bei Patienten mit Autismus-Spektrum-Erkrankungen (Ching et al., 2010; Feng et al., 2006; Kim et al., 2008; Liu et al., 2012), Mutationen in Nrnx1 und Nlgn2 bei Patienten mit Schizophrenie (Kirov et al., 2009; Sun et al., 2011) und Deletionen in Nrnx1 bei Patienten mit Epilepsie (Moller et al., 2013). In diesem Zusammenhang postulierte die amerikanische Wissenschaftlerin Huda Zoghbi ein „*meeting at the synapse*“. Hiermit charakterisierte sie den Sachverhalt, dass zumindest bei einigen psychiatrischen Krankheiten Defekte in der synaptischen Funktion nachweisbar waren und daher unterschiedliche Pathologien an der Synapse aufeinandertreffen (Zoghbi, 2003). Obwohl die Nlgn-Mutationen mit einer Häufigkeit von ca. 0,4% bei Autisten sehr selten sind, können sie somit als Modell für die Krankheitsentstehung dienen und sind molekularbiologisch bedeutend (Ylisaukko-oja et al., 2005).

Eine Mutation, die sich bei zwei Autisten in Schweden fand, bestand aus dem Austausch von Arginin zu Cystein an Stelle 451 (Arg451Cys) in Nlgn3 (Jamain et al., 2003). Sie behinderte weder die Dimerisierung der Nlgn noch die Bindung an Nrnx (Chen et al., 2008), sondern hielt die Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurück, sodass die Oberflächenexpression herabgesetzt war (Chih et al., 2004; Comoletti et al., 2004; De Jaco et al., 2006). Gleichzeitig blieb die synaptogenetische Wirkung des Nlgn erhalten (Chih et al., 2004; Chubykin et al., 2005). Auch homologe Mutationen zu Arg451Cys in anderen Mitgliedern der α -/ β -Hydrolasefamilie und eine Autismusmutation in Nlgn4, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führte, wurden im ER zurückgehalten und verdeutlichten damit die Wichtigkeit einer korrekten Proteinprozessierung für die Oberflächenexpression (Chih et al., 2004; De Jaco et al., 2006; Sun et al., 2011; Zhang et al., 2009). Einige Mutationen wie die Autismusmutation Arg87Trp in Nlgn4 und wahrscheinlich die Schizophreniemutation Arg215His in Nlgn2 wiesen eine fehlerhafte Glykosylierung auf und wurden ebenfalls von der Qualitätskontrolle des ER aussortiert (Sun et al., 2011; Zhang et al., 2009). Überraschenderweise verfügten Mäuse mit der

Arg451Cys-Mutation über eine verstärkte inhibitorische Signalübertragung in Form einer erhöhten Frequenz der spontanen Vesikelfreisetzung (Tabuchi et al., 2007). Dies steht nicht im Einklang mit der These, dass Autismus aufgrund eines erhöhten Verhältnis von Exzitation zu Inhibition entstehen kann (Rubenstein et al., 2003; Tabuchi et al., 2007).

Insgesamt ist die Klinik der Patienten mit Mutationen in *Nrxn* und *Nlgn* weit gefächert: In einer Fallstudie von 12 Patienten mit Exondeletionen in *Nrxn1* fanden sich neben Autisten auch Patienten mit Hypotonie, Ventrikelseptumdefekten, Hämangiomen, verzögerter Sprachentwicklung sowie mentaler Retardierung ohne Autismus (Ching et al., 2010). Außerdem zeigen aktuelle Genomanalysen, dass Mutationen in den *Nrxn*-Genen bei diversen anderen Pathologien nachweisbar sind wie Nikotin- (Bierut et al., 2007; Novak et al., 2009) und Alkoholabhängigkeit (Hishimoto et al., 2007; Stoltenberg et al., 2011), der Entwicklung von Übergewicht (Heard-Costa et al., 2009) und Impulsivität (Stoltenberg et al., 2011). Andererseits fanden sich Einzelnukleotidpolymorphismen in *Nrxn3*, die mit einem geringeren Risiko zu rauchen signifikant assoziiert waren (Docampo et al., 2012). Eine endgültige Definition der Funktion der *Nrxn* und *Nlgn*, insbesondere getrennt nach den einzelnen Isoformen, steht noch aus. Die Fähigkeit der *Nlgn* und *Nrxn* den jeweils anderen Bindungspartner zu den neugebildeten Synapsen zu rekrutieren (Dean et al., 2003; Graf et al., 2006), weist jedoch darauf hin, dass einige der Funktionen durch das Zusammenspiel der beiden Moleküle entstehen. Daher widmet sich der folgende Abschnitt den Funktionen des *Nrxn/Nlgn*-Komplexes.

1.6 Der transsynaptische *Nrxn/Nlgn*-Komplex

Mit der Beschreibung der *Nlgn* als Bindungspartner der *Nrxn* (Ichtchenko et al., 1995) begann auch die genaue Charakterisierung des Komplexes der beiden Moleküle, der strukturelle Besonderheiten aufweist. Im Gegensatz zu den meisten anderen synaptischen Adhäsionsproteinen erfolgt die Interaktion zwischen *Nrxn* und *Nlgn* heterophil und spiegelt somit die Asymmetrie der Synapse wider (Nguyen et al., 1997).

Die beiden Bindungspartner konzentrieren sich auf je eine Seite des synaptischen Spaltes mit dem Großteil des *Nrxn1 β* und *Nrxn1 α* an der präsynaptischen Endigung sowie der Mehrheit des *Nlgn* am postsynaptischen Neuron, sodass es sich um einen transsynaptischen Komplex handelt (Berninghausen et al., 2007). Trotzdem befindet sich ein geringer Anteil der *Nrxn* an der Postsynapse und reguliert dort über *cis*-Interaktion mit *Nlgn* ihre synaptogenetische Aktivität herunter (Taniguchi et al., 2007). Inzwischen weiß man, dass sich zur Bildung des transsynaptischen Komplexes aus *Nlgn* und LNS6/ β -*Nrxn* zwei *Nrxn*-Moleküle jeweils an einer Seite des *Nlgn*-Dimers anordnen und sich daher ein *Nrxn/Nlgn*-Verhältnis von 2:2 ergibt (Araç et al., 2007; Chen et al., 2008; Comoletti et al., 2007; Comoletti et al., 2008; Fabrichny et al.,

2007). In der Kristallstruktur interagiert der Rand des Nr_{xn} gegenüber dem N- und C-Terminus mit der Esterase-Artigen-Domäne des Nlgn in der Nähe der Spleißeinfügung B (Araç et al., 2007; Chen et al., 2008; Fabrichny et al., 2007). Die Nr_{xn} und Nlgn ordnen sich so an, dass die lange Achse des Nlgn-Dimers senkrecht zu den β -Faltblättern des β -Nr_{xn}/der LNS6 steht (Araç et al., 2007; Chen et al., 2008; Fabrichny et al., 2007). Eine solche Komplexanordnung ist auch für α -Nr_{xn} denkbar, bei dem die Interaktion über die LNS6 erfolgt, während sich der große N-Terminus längs des Nlgn anordnet (Chen et al., 2011; Miller et al., 2011).

Im Hinblick auf die Komplexbildung stellt sich die Frage, welche Eigenschaften der Nr_{xn} und Nlgn essentiell sind. Zum einen ist die Bindung der beiden Moleküle streng calciumabhängig und lässt sich nicht durch andere divalente Kationen substituieren (Comoletti et al., 2003; Nguyen et al., 1997). Die Calciumbindung erfolgt über die Aminosäurereste Val 154, Ile 236, Asp 137 und Asn 238 der LNS6 (Nummerierung von Nr_{xn}1 β) sowie zwei Wassermoleküle, die zusammen eine oktaedrische Konfiguration ergeben (Chen et al., 2008). Bereits die Mutation einzelner Aminosäuren (AS) der Calciumbindungsstelle zu Ala oder Arg verhinderte die Bindung an Nlgn in pulldown-Experimenten, neutralisierte die synaptogenetische Wirkung in der Zellkultur und wies damit die essentielle Bedeutung dieser AS nach (Graf et al., 2006; Reissner et al., 2008). Des Weiteren ist für die Bindung eine hydrophobe Region der LNS6/ β -LNS um die Calciumbindungsstelle erforderlich, die wahrscheinlich direkt an Nlgn bindet (Reissner et al., 2008). Im Unterschied dazu hatten die Spleißeinfügungen der Nr_{xn} und Nlgn sowohl in pulldown-Experimenten (Reissner et al., 2008) als auch in Experimenten mit Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR)-Technologie (Koehnke et al., 2010) eine modulatorische Funktion für die Bindung und wirkten nicht nach einem Alles-oder-Nichts-Prinzip (Reissner, 2009). Lediglich eine Kombination aus Nlgn mit Spleißeinfügung B und einer vollständigen extrazellulären Sequenz des α -Nr_{xn} mit Spleißeinfügung 4 verhinderte die Bindung aufgrund sterischer Inhibition zwischen den beiden Molekülen (Reissner et al., 2008; Tanaka et al., 2011).

1.7 SPR-Technologie als Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen

Die vorherigen Kapitel zeigen, dass eine Vielzahl von Methoden wie Elektrophysiologie- und Zellkulturexperimente, Kristall- sowie Tiermodelle bei der Charakterisierung der Interaktion zwischen Nr_{xn} und Nlgn Anwendung fanden. Seit einigen Jahren werden diese durch Untersuchungen mittels der SPR-Technologie ergänzt. Die SPR ist eine optische Messmethode, die die Interaktion zweier Bindungspartner misst, von denen einer auf einem modifizierten Goldchip kovalent immobilisiert ist (Ligand) und der andere in Lösung vorliegt (Analyt) (de Crescenzo, 2008; Homola, 2003; Myszka, 1997; Piliarik et al., 2009; Torneri et al., 2005; Willander et al., 2009). Die genauen physikalischen Prinzipien der Messung finden sich im

Material- und Methodenteil dieser Arbeit, während dieses Kapitel in den grundlegenden Ablauf der Messung einführt. Für die technische Umsetzung der SPR-Messung benötigt jedes System drei Komponenten (Piliarik et al., 2009; Torrerri et al., 2005):

1) ein molekulares Erkennungselement (Ligand): In der am weitesten verbreiteten Messkonfiguration bindet der Ligand an eine hydrogelartige Matrix aus Carboxymethyldextranen (CMD), die sich auf einem Messchip aus Gold befinden (s. Abb. 5; de Crescenzo, 2008; Van Regenmortel, 2003). Gold zeichnet sich gegenüber anderen Materialien durch eine sehr gute Inertheit aus, die es gegenüber Puffer- und Probeneinflüssen wenig vulnerabel macht. Des Weiteren besitzt Gold eindeutig zu messende optische Eigenschaften und bietet die Möglichkeit der Modifikation seiner Oberfläche, sodass Liganden auf dem Chip immobilisiert werden können. (Jason-Moller et al., 2006)

2) System zur Probenvorbereitung und –zuführung: Für die Zuführung und den Abtransport des Analyten stehen flusszellenbasierte Systeme mit angeschlossener Pumpe oder küvettenbasierte Systeme zur Verfügung (de Crescenzo, 2008; Piliarik et al., 2009). Das verwendete SPR-Spektrometer SR7000DC der Fa. Reichert nutzt ein flusszellenbasiertes System.

3) optische Detektorhardware: Diese Komponente beinhaltet die Lichtquelle, die Einkopplungsoptik, den Detektor für das reflektierte Licht und ein System zur Datenverarbeitung (Piliarik et al., 2009).

In einem ersten Schritt wird der Ligand auf die Oberfläche des modifizierten Goldchips gebunden. Dies erfolgte in den hier beschriebenen Experimenten über eine Aminokopplung des Liganden an einen CMD-Chip. Für gesonderte Experimente wurden Ig fusionierte Liganden eingesetzt und an einen mit einer Protein-A-Matrix gekoppelten Messchip (PA-CMD) gebunden. Aus Abb. 5 geht hervor, dass sich die Ligandenmoleküle (B) zufällig in der CMD-Matrix verteilen und diese daher inhomogen ist (O'Shannessy, 1994). Moleküle des Analyten (A) können nun aus dem Fluss zur Chipmatrix diffundieren und mit dem immobilisierten Liganden interagieren (s. Abb. 5). Eine 1:1-Interaktion wie in Abb. 5 lässt sich mit folgendem Schema darstellen (O'Shannessy, 1994; Van Regenmortel, 1994):



Hierbei bezeichnen k_a und k_d jeweils die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation bzw. Dissoziation und AB den aus A und B gebildeten Komplex (O'Shannessy, 1994; Van Regenmortel, 1994).

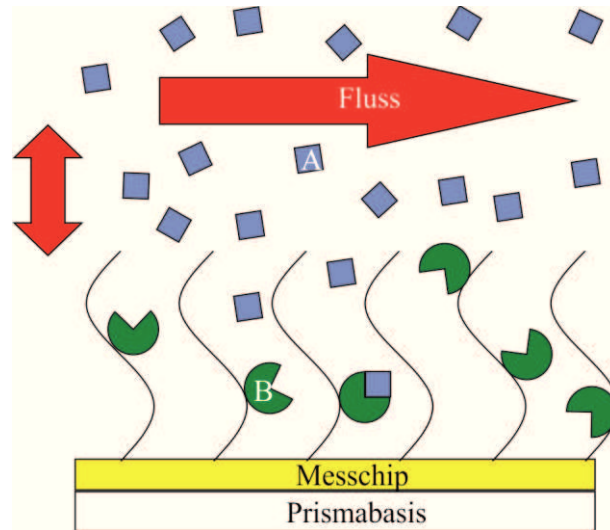


Abb. 5: Flussschema der SPR-Messung in der Injektionsphase. Der Ligand (B, grün) befindet sich in zufälliger Verteilung auf dem Messchip und der Analyt (A, blau) liegt in Lösung vor. In der hier dargestellten Injektionsphase wird der Analyt mit dem Fluss zugeführt und kann per Diffusion zur CMD-Matrix (Wellenlinien) des Messchips (gelb) gelangen, um dort an den Liganden zu binden. Der Doppelpfeil links weist darauf hin, dass der Analyt in beide Richtungen diffundieren kann, d.h. zum Messchip hin bzw. zurück in den Fluss. Genauere Bindungs- und Messabläufe siehe Text. Abbildung modifiziert nach (O'Shannessy, 1994).

Im Experiment gliedert sich jeder SPR-Messzyklus in vier Phasen, die konsekutiv ablaufen (s. Abb. 6): Nulllinie, Injektionsphase, Dissoziationsphase und Regenerationsphase. Das SPR-Signal wird in der dimensionslosen Resonanzeinheit (resonance unit, RU) gemessen, die proportional zur gebundenen Masse ist, wobei 1 RU bei eingestrahlttem Licht von 750 nm einer Bindung von 1 pg/mm² entspricht (Myszka, 1997; Piliarik et al., 2009; Van Regenmortel, 1994, 2003). Das in dieser Arbeit verwendete System SR7000DC besitzt eine Messgenauigkeit von bis zu 0,1 RU. Durch kontinuierliche Aufzeichnung des SPR-Signals über die Zeit entsteht ein Sensogramm als Darstellung der SPR-Messdaten (Torreri et al., 2005; Van Regenmortel, 1994, 2003).

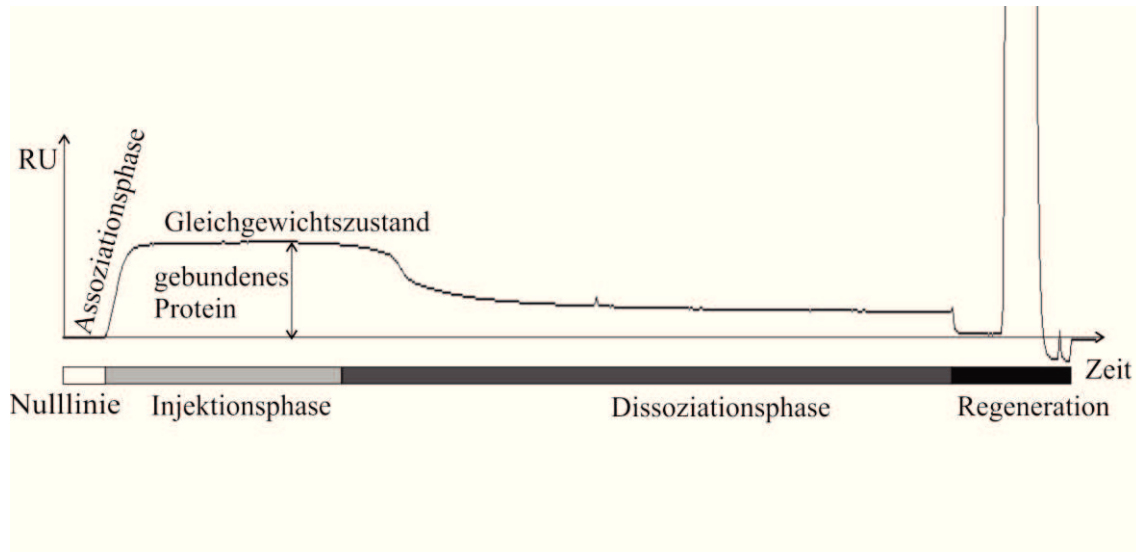


Abb. 6: Die vier Phasen des SPR-Messzyklus. Das Sensogramm zeigt den SPR-Signalverlauf in Abhängigkeit von der Zeit. Die Nulllinie bildet den Ausgangspunkt der Messung. Mit Beginn der Injektionsphase fließt eine Proteinlösung über den Chip und der Komplex bildet sich (Assoziationsphase), bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. In der darauffolgenden Dissoziationsphase wird erneut nur Puffer zugeführt und das gebundene Protein löst sich ab. Noch gebundene Analytenmoleküle werden abschließend mithilfe der Regenerationslösung von der Chipoberfläche entfernt. Hierbei ist zu beachten, dass die Regenerationslösung mit EDTA einen Signalausschlag von mehreren Tausend RU erzeugt. Dieser kann in der Abbildung nicht vollständig dargestellt werden, sodass die Regenerationsphase eine scheinbare „Lücke“ hat. Für weitere Details s. Text. Abbildung nach (Karlsson, 2004), modifiziert mit eigener Signalkurve.

1) Nulllinie: Die Messung beginnt mit dem Fließen von Laufpuffer ohne Analyten über den Chip (Torreri et al., 2005). Es findet folglich auch keine Bindung an den Liganden statt; das SPR-Signal in dieser Phase dient als Nulllinie.

2) Injektionsphase: In dieser Phase erfolgt die Injektion des Analyten, sodass sich der Komplex AB bilden kann und das SPR-Signal ansteigt (de Crescenzo, 2008; Kastritis et al., 2013; Van Regenmortel, 2003). Einerseits diffundieren Moleküle des Analyten an die Matrix auf dem Chip und binden an Ligandenmoleküle, andererseits können sich bereits gebundene Analytenmoleküle wieder lösen und in die Lösung diffundieren (O'Shannessy, 1994). Auf diesen Zusammenhang weist Abb. 5 mittels des dargestellten Doppelpfeils hin. Entsprechend ergibt sich die Bildungsrate des Komplexes AB aus der Differenz zwischen Assoziation und Dissoziation (Van Regenmortel, 1994):

$$(II) \quad d[AB]/dt = k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB]$$

Zu Beginn der Injektionsphase überwiegt die Assoziation und das Bindungssignal steigt an (Homola, 2003). Gleichung (II) verdeutlicht, dass mit zunehmender Bildung des Komplexes der Subtrahend $k_d \cdot [AB]$ zunimmt und dadurch die Bindungsrate vermindert wird. Schließlich ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem Assoziation und Dissoziation gleich schnell erfolgen (Homola, 2003; Piliarik et al., 2009). Entsprechend wird die Injektionsphase in zwei Zeitabschnitte eingeteilt; die initiale Assoziationsphase, gefolgt vom Gleichgewichtszustand (s. Abb. 6).

3) Dissoziationsphase: In dieser Phase fließt erneut nur Laufpuffer über den Chip, sodass die noch gebundenen Analytenmoleküle nach und nach von der Chipmatrix abdiffundieren und das SPR-Signal sinkt (de Crescenzo, 2008; Kastritis et al., 2013; Torreri et al., 2005; Van Regenmortel, 2003).

4) Regenerationsphase: Letzte Analytenmoleküle werden mithilfe einer definierten Regenerationslösung vom Chip entfernt, der damit bereit ist für den nächsten Messzyklus (de Crescenzo, 2008; Torreri et al., 2005; Van Regenmortel, 2003).

Gemessen an der Anzahl der Publikationen liegt das Hauptanwendungsgebiet der SPR-Technologie in der Messung von Protein-Protein-Interaktionen (Jason-Moller et al., 2006; Karlsson, 2004). Auch der Komplex aus Nrnx und Nlgn gehört zu den Interaktionen zwischen zwei Proteinen.

Die bisherigen SPR-Experimente zum Nrnx/Nlgn-Komplex charakterisierten das Bindungsverhalten von α - und β -Nrnx an Nlgn (Boucard et al., 2005; Miller et al., 2011) und Unterschiede zwischen den Nlgn1-4 in Interaktion mit der LNS6/ extrazellulären Sequenz von β -Nrnx (Comoletti et al., 2006; Leone et al., 2010). Des Weiteren wurden die Auswirkungen von Spleißeinfügungen (Boucard et al., 2005; Comoletti et al., 2006; Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010), Mutationen an der Nrnx/Nlgn Komplexbindungsstelle (Araç et al., 2007) und einer Autismusmutation (Comoletti et al., 2004) auf die Interaktion untersucht. Ebenso konnten mithilfe der SPR Erkenntnisse über die Rolle der Glykosylierungen in Nlgn1 (Boucard et al., 2005; Comoletti et al., 2003) und den Einfluss von Ionen auf die Komplexbildung (Comoletti et al., 2003; Leone et al., 2010) gewonnen werden.

Im Vordergrund der bisherigen Experimente stand unter anderem die Analyse des Einflusses der Spleißeinfügung 4, der zunächst eine regulatorische Funktion nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip zugeschrieben wurde (Ichtchenko et al., 1996). In SPR-Experimenten zeigte sich, dass sie in α -Nrnx die Bindung zu Nlgn ohne Spleißeinfügung B (Nlgn Δ B) um die Hälfte schwächte (Boucard et al., 2005). Auch die Interaktion zwischen der LNS6 und Nlgn1 und 2 wurde durch die Spleißeinfügung 4 erschwert, die Bindung an Nlgn3 dagegen erleichtert (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010). Jedoch demonstrierte eine andere Arbeit zur Spleißeinfügung 4

eine Verschlechterung der Komplexbildung nur für β -Nrxn und Nlgn1 und wies eine bevorzugte Bindung von Nlgn2-4 an β -Nrxn mit Spleißeinfügung 4 nach (Comoletti et al., 2006). Insofern existiert bis jetzt keine einheitliche Definition der Funktion dieser AS-Sequenz.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Seit der Entdeckung der Nrxn und der Nlgn konnten wesentliche strukturelle und funktionelle Aspekte ihrer Interaktion aufgeklärt werden. Trotzdem sind einige Charakteristika der Bindung wie beispielsweise die Rolle des spezifischen N-Terminus von β -Nrxn nur unzureichend verstanden. Diese strukturelle Besonderheit von β -Nrxn, für die es in α -Nrxn keine Entsprechung gibt, besteht in einer N-terminalen AS-Sequenz, die einen auffallend hohen Anteil von Glyzin, Prolin und Histidin enthält. Die Funktion dieser Sequenz ist unklar, aber es existieren kontroverse Vorstellungen, nach denen diese Sequenz die Bindung an Nlgn entweder entscheidend vermittelt (Ichtchenko et al., 1995) oder gar nicht berücksichtigt wird (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010; Miller et al., 2011).

In dieser Arbeit soll daher die Bedeutung der β -spezifischen Sequenz für die Interaktion mit Nlgn eingehend untersucht werden. Dazu wird ein Vergleich zwischen der LNS6 ohne β -spezifische Sequenz und der LNS6 mit β -spezifischer Sequenz erfolgen, um den direkten Einfluss des N-Terminus mittels der SPR-Technologie zu messen.

Die auf die Nrxn/Nlgn-Interaktion angewandte SPR-Technologie ist eine dynamische Messmethode, die qualitative und quantitative Daten liefert, aber für ihre Durchführung auf die benutzten SPR-Spektrometer abgestimmt werden muss. Daher muss in dieser Arbeit ein spezifisches Messprotokoll etabliert werden, dass die Messung der Interaktion zwischen Nrxn und Nlgn auf dem zur Verfügung stehenden Gerät (SR7000DC, Fa. Reichert) ermöglicht. Darüber hinaus wird auch die Bindung von α -Nrxn an Nlgn untersucht und die SPR-Resultate mit anderen Analysen der Nrxn/Nlgn-Interaktion kritisch verglichen und diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

A	Analyt
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
B	Ligand
BSA	bovines Serumalbumin
Cbln1	cerebellin 1 Vorläuferprotein
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre DNA)
CM(D)	Carboxymethyl(dextran)
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
HCl	Salzsäure
HRV	humanes Rhinovirus
IE	internationale Einheit
k _a	Assoziationskonstante
k _d	Dissoziationskonstante
K _d	Dissoziationskonstante im Gleichgewicht
LB	Laura Bertani-Medium
LNS	Laminin-Neurexin-Sexual-Hormon-Bindendes-Globulin
LRRTM	<i>Leucin-rich repeat transmembrane protein</i>
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
n _{ef} , n _p	Brechungsindices
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Nlgn	Neurologin

Nlgn Δ A, B, AB	Neurologin ohne Spleißeinfügung A, B, A und B
Nrxn	Neurexin
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i> (Nitrioltriessigsäure)
OP	Oberflächenplasmon
PA	Protein A
PDZ	PSD95-, DLG-a-, Zol-artiges Protein
PSD	postsynaptische Dichte
RT	Raumtemperatur
RU	<i>resonance units</i> (Resonanzeinheiten)
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
SS	<i>splice site</i> (Spleißstelle)
T50	50 mM Tris-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UPPA	<i>Universal Protein Precipitation Agent</i> (universelles Protein Präzipitationsmittel)

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Amicon 3k Gefäß	Millipore, zu Merck, Darmstadt
Autoklave	Varioklav von H+P Labortechnik (jetzt: HP Medizintechnik, Oberschleißheim), VX-95 von Systec, Wettenberg
Autosampler	SR7100 von Reichert Technologies, zu AMETEK, Paoli (USA)
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, Hercules (USA)
Chemikalienschrank	Düperthal, Karlstein
Digitalwaagen	TE1502 S von Sartorius, Göttingen
Diverter Valve	SR7600 von Reichert Technologies, zu AMETEK, Paoli (USA)
Drucker	P93 D von Mitsubishi Electric, Tokyo (J)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektroporator (E.coli pulser)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Gelapparaturen	Bio-Rad, Hercules (USA)
Geldokumentationssystem	DeVision Debox von Decon Science Tec, Hohengandern 1200 UB Plus von Mustek Systems, Hsin Chu (TW)
Gelkammer für Agarosegele	Hofer, Holliston (USA)
Geltrockner	Bio-Rad, Hercules (USA)
Heizblock	Unitek HB-130 von Schütt Labortechnik, Göttingen
dd H ₂ O	SG Water, zu Siemens, München
Hochgeschwindigkeitszentrifuge	Sorvall RC-5B plus und RC6 Plus von Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Inkubator (LB-Platten)	Binder, Tuttlingen
Inkubator/Brutschrank	MCO-18AIC von Sanyo, zu Panasonic, Kadoma (JP)
Kühlschränke	Bosch, Gerlingen Liebherr, Bulle (CH) Sanyo, zu Panasonic, Kadoma (JP)
Zentrifuge für 15 ml und 50 ml Gefäße	5804R und 5810R von eppendorf, Hamburg
Leuchtplattentisch	Rex-Leuchtplatten, Blaustein
Lichtmikroskop	Axiovert 25 von Carl Zeiss, Oberkochen

Geräte Fortsetzung

Magnetrührplatten	Variomag von H+P Labortechnik (jetzt: Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)), IKA RH basic 2 von IKA, Staufen
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen
pH-Meter	inoLab pH level 2 von WTW Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten, Weilheim
Pipetten	eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton (USA)
Rotator	test-tube rotator 34528 von Snijder Scientific, Tilburg (NL); LD 79 von Labinco, Breda (NL)
Schüttler für Bakterienkulturen	innova 4330 und innova 40 von New Brunswick Scientific, zu eppendorf, Hamburg
Schüttler für Eppendorfgefäße	Thermomixer compact 5350 von eppendorf, Hamburg
Schüttler für Elektrophoresegel	IKA KS 260 basic von IKA, Staufen
Semi-Automatic valve	SR7300 von Reichert Technologies, zu AMETEK, Paoli (USA)
Sonicator	Sonorex RK 100, Transistor von Bandelin electronic, Berlin
SPR-Pumpe	SR7500 von Reichert Technologies, zu AMETEK, Paoli (USA)
SPR-Spektrometer	SR7000DC von Reichert Technologies, zu AMETEK, Paoli (USA)
Spektrophotometer	eppendorf, Hamburg
Spektrophotometerküvetten	UVette von eppendorf, Hamburg
Sterilisationsofen	Binder, Tuttlingen
Sterilisator	Fine Science Tools, Foster City (USA)
Sterilwerkbank	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Stromgerät für Elektrophorese	Standard Power Pack P 25 von Biometra, Göttingen
Tiefkühlschrank	MDF-U6086S von Sanyo, zu Panasonic, Kadoma (JP) Ultra Low Freezer von Sanyo, zu Panasonic, Kadoma (JP)
Tiefkühltruhe	
Tischzentrifuge	5424 von eppendorf, Hamburg
Vakuumfiltrationseinheiten	Sarstedt, Nümbrecht; Millipore, zu Merck, Darmstadt

Geräte Fortsetzung

Vortexer	MS2 Minishaker von IKA, Staufen , Vortex Genie 2 von Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad	Huber, Offenburg; SW 22 Shaking Water Bath und EcoTemp TW 12 von Julabo Labortechnik, Seelbach

2.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamidlösung (30%)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Aktivierungspuffer	XanTec bioanalytics, Düsseldorf
All-Blue-Proteinstandard	Bio-Rad, Hercules (USA)
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ammoniumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anti-Neurologin 1 (4C12)	Synaptic Systems, Göttingen
Anti-Nxph-1	Eurogentec, Seraing (BE)
APS	Roth, Karlsruhe
BamH I (EC 3.1.23.6)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Borat-Elutionspuffer	XanTec bioanalytics, Düsseldorf
BSA (fest)	PAA, zu GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
BSA-Lösung (für Enzymverdau)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenol-	USB/Amersham Life Sciences, zu General
Blau	Electric Healthcare, Little Chalfont (UK)
Butanol	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassie	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
Desorb 1	XanTec bioanalytics, Düsseldorf
Desorb 2	XanTec bioanalytics, Düsseldorf
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
DMEM	Gibco, zu Life Technologies, Carlsbad (USA); Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DNA-Standard	Invitrogen (jetzt: Life Technologies, Carlsbad (USA))
EDC*HCl	XanTec bioanalytics, Düsseldorf
EDTA	Serva, Heidelberg; Roth, Karlsruhe

Chemikalien Fortsetzung

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	Gibco, zu Life Technologies, Carlsbad (USA)
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
10*HRV 3C Verdaupuffer	Novagen, zu Merck, Darmstadt
HRV 3C Protease (EC 3.4.22.28)	Novagen, zu Merck, Darmstadt
Immersionsöl (Typ A)	Cargille, Cedar Grove (USA)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
LB Agar	Invitrogen (jetzt: Life Technologies, Carlsbad (USA)) Invitrogen (jetzt: Life Technologies, Carlsbad (USA))
LB-Broth Base	Carlsbad (USA))
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
tri-Natriumcitrat-dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nickel-NTA beads	Qiagen, Hilden
Nivellierungspuffer	Xantec bioanalytics, Düsseldorf
Nucleobond PC 500-Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
PBS	Biochrom, zu Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (jetzt: Life Technologies, Carlsbad (USA))
pH-Papier	MACHEREY-NAGEL, Düren
Pierce Konzentrator-System	Thermo Scientific, Waltham (USA)
prä-Immun-Serum (Kaninchen)	Eurogentec, Seraing (BE)
Protein-A	General Electric Healthcare, Little
Sepharose beads	Chalfont (UK)

Chemikalien Fortsetzung

Protein-Elektrophorese-Standard	Bio-Rad, Hercules (USA)
Pur-A-Lyzer Mini 6000 Dialyse-System	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Pellets)	Roth, Karlsruhe
SPR-Chip (CMD 200m, CMD 500l)	XanTec bioanalytics, Düsseldorf
SPR-Probenfläschchen	Roth, Karlsruhe
Spincolumn	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Stickstoff	Westfalen AG, Münster
TEMED	Fluka, zu Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tetracyclin	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco, zu Life Technologies, Carlsbad (USA)
Tween 20	Roth, Karlsruhe
UPPA-Proteinkonzentrierungskit	G-Biosciences, St. Louis, (USA)
Urea	Eurobio, Les Ulils, (F)
Verdaupuffer III (NeBuffer 3, 10*)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Zellophanfolien zum Einbinden der Gele	Bio-Rad, Hercules (USA)
Ziege-Anti-Kaninchen IgG (H+L)	
HRP Konjugat	Bio-Rad, Hercules (USA)

Chargennummern

SPR Sensorchips CMD 200m	SC CMD 200m 0509.a, 1110.a
SPR Sensorchips CMD 500l	SC CMD 500l 1208.a

2.4 Bakterienstämme

Escherichia coli XL-1 Blue MRF, Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.5 Zellkulturmedien und antibiotische Zusätze

Für das *Laura Bertani (LB)-Medium* wurden 16 g Peptone 140 mit 10 g Hefeextrakt und 5 g NaCl vermischt und 1 l dd H₂O hinzugegeben; zusätzlich zur Eindämmung von Kontaminationen Penicillin (10.0000 IE/ml) und Streptomycin (10.000 µg/ml) hinzugefügt. Der *LB-Agar* setzte sich zusammen aus 1 l LB-Medium und 12,5 g Agar.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enthielt 500 ml DMEM mit 2% Glutamin und 4,5 g/l Glucose (Invitrogen #41965-062), vermischt mit 5 ml antibiotischem Zusatz aus Penicillin und Streptomycin (Invitrogen #15070-063) und optional vermischt mit 50 ml Kälberserum (FCS, Invitrogen #10270-106).

2.6 Zellkulturen

In der Zellkultur fanden humane embryonale Nierenzellen vom Typ HEK293 der Firma Invitrogen Verwendung.

2.7 Vektoren

Die Konstrukte für die LNS6, β -Nr_{xn} und α -Nr_{xn} entsprechen den in der Vergangenheit beschriebenen Konstrukten (Reissner, 2009). Der Vektor für Nlgn ohne Spleißeinfügung B (Nlgn Δ B) mit Schnittstelle für die Protease 3C wurde freundlicherweise von Dr. Carsten Reissner bereitgestellt.

Für die Molekulargewichte gilt:

LNS6 ohne Spleißeinfügung 4	47.257,3 Da
β -Nr _{xn} ohne Spleißeinfügung 4	50.955,4 Da
α -Nr _{xn} mit Spleißeinfügung 3a und 4	202.690,1 Da
Nlgn Δ B	75.282,8 Da

2.8 Zellbiologische Methoden

Die Nrnx- und Nlgn-cDNA wurde mithilfe der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode in HEK293-Zellen eingebracht. Nach drei Tagen wurde der Überstand geerntet und das enthaltene Protein in einem mehrschrittigen Aufbereitungsprozess für die SPR vorbereitet (Übersicht in Abb. 7).

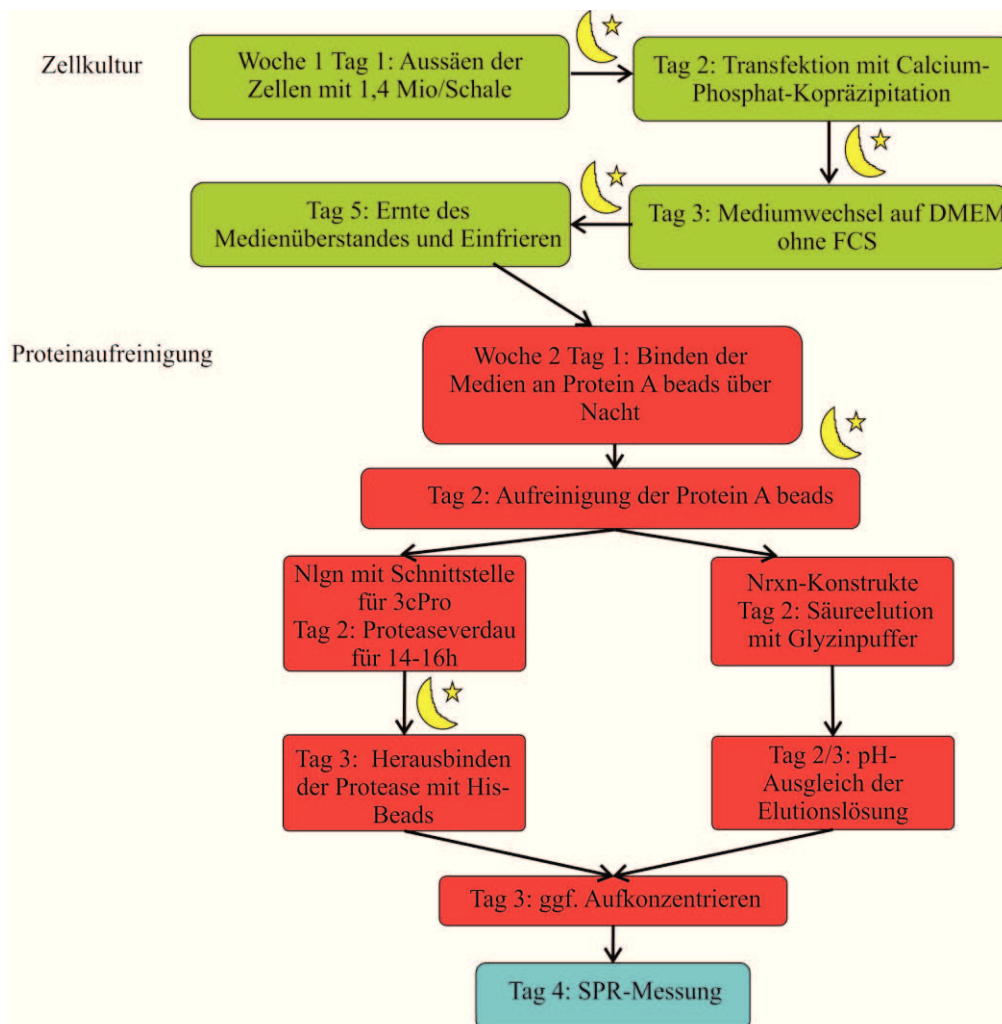


Abb. 7: Gesamtübersicht des experimentellen Ablaufs. Die insgesamt zweiwöchige Aufbereitung setzte sich aus Zellkultur (1. Woche, grün) und Proteinaufreinigung (2. Woche, rot) zusammen. In dieser Abbildung wird die Abfolge der einzelnen Schritte durch Pfeile verdeutlicht. Bis zum Beginn der zweiten Woche (2. Woche Tag 2) war die Aufbereitung von Nrnx und Nlgn identisch, anschließend erfolgte eine spezifische Weiterverarbeitung (Nlgn links, Nrnx rechts). Die Aufkonzentration am Ende war für beide Bindungspartner gleichartig. Das Mondsymboll verdeutlicht, dass der jeweilige Schritt ein Wachstum über Nacht (Zellkultur) bzw. eine Inkubation mit Protein A oder Protease über Nacht (Proteinaufreinigung) erforderte. Den Abschluss der Aufbereitung bildete die gemeinsame Messung in der SPR (blau).

Dabei erfuhren Nr_{xn} und Nl_{gn} nach einer initialen Aufreinigung eine spezifische Weiterbearbeitung (s. 2.9 Proteinbiochemische Methoden). Die gereinigten Proteinlösungen wurden schließlich aufkonzentriert und für die SPR-Messungen verwendet.

2.8.1 Transfektion von HEK293-Zellen

Lösungen: 500 ml DMEM (Zusammensetzung s.o.), 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen #25200-056), PBS, 250 mM CaCl₂, 2-fach HEPES-Puffer (pH: 7,05) mit 40 mM HEPES, 274 mM NaCl, 12 mM D-Glucose, 10 mM KCl, 1,4 mM Na₂HPO₄

Die Inkubation der HEK293-Zellen erfolgte in DMEM mit FCS und Penicillin/Streptomycin im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Vor der Transfektion wurden die Zellen von einer Ursprungsplatte auf die gewünschte Anzahl Platten verteilt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und verworfen, die Platten mehrfach mit 5 ml PBS gewaschen und danach mit 3 ml einer 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung behandelt, sodass die Zellen von ihrer Unterlage abgelöst wurden. Die Zugabe von 6 ml DMEM mit FCS und Penicillin/Streptomycin beendete die Einwirkung der Trypsin-Lösung. Abschließend wurden die Zellen abgenommen, lichtmikroskopisch gezählt und auf neue Platten zu je 1,4 Mio. Zellen ausgebracht.

Am nächsten Tag wurde die Transfektion mittels Calciumphosphatkopräzipitation durchgeführt. Hierzu wurde zunächst 28 µl DNA für jede Platte bereitgestellt und mit 672 µl 250 mM steril gefiltertem CaCl₂ vermischt. Anschließend fügte man 700 µl steril filtriertem HEPES-Puffer (pH 7,05) hinzu. Durch leichtes Vortexen wurde die Transfektionslösung vermischt, danach 15-20 min inkubiert und auf die Zellen verteilt.

Nach einem Tag Inkubation erfolgte der Wechsel auf ein DMEM-Medium ohne FCS, sodass die Beimischung von Serumantikörpern vermieden wurde. Drei Tage später wurde der Überstand in 50 ml Gefäße dekantiert, die zum pH-Ausgleich 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 7,5 enthielten. Zellreste in der Ernte wurden durch Abzentrifugation für 3 min mit 800 g bei Raumtemperatur (RT) und anschließende Filtration durch einen Papierfilter entfernt, die Proteinlösung in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufreinigung gelagert.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

Die von den HEK293-Zellen produzierten Proteine wurden aus dem Überstand in einem mehrteiligen Reinigungsprozess isoliert und für die SPR-Messungen gereinigt. Dazu wurden die IgG-Fusionskonstrukte zunächst an Protein-A beads gebunden, nachfolgend gereinigt, durch Säureelution/Proteinverdau von den beads abgetrennt und schließlich in die SPR-Laufpuffer

überführt. Einzelne Schritte wurden mithilfe der SDS-Gelelektrophoresen kontrolliert und dokumentiert (s.u.).

Chemikalien: 50 mM Tris (pH 7,5/7,05); 50 mM Tris mit 5 mM CaCl₂ (optional mit 80 mM NaCl), 5 mM/50 mM Natriumacetat (pH 2, pH 7,5); 100 mM Glyzinpuffer (pH 2,7) mit 5 mM CaCl₂ 1 mM MgCl₂ und 150 mM NaCl; Protein-A-beads (General Electric Healthcare #17-5138-01); humanes Rhinovirus (HRV) 3C Protease (Novagen 20 U/μl #71493); 10-fach HRV 3C Verdaupuffer (Novagen #71492); Ni-NTA Agarosebeads (Qiagen # 30210)

2.9.1 Äquilibration der Protein A beads

Die Äquilibration der Protein-A sepharose beads erfolgte in 50 mM Tris Puffer pH 7,5 (T50). Nach Vermengung mit 1,4 ml 50 mM Tris Puffer rotierten die beads für 5 min bei 4° und wurden anschließend für 30 s mit 11.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die beads nach dreimaliger Durchführung der Äquilibration bei 4°C gelagert.

2.9.2 Bindung der IgG Fusionsproteine an Protein A beads

Das gefrorene Medium wurde in einem Wasserbad bei 37° aufgetaut und mit 50 μl Protein A-beads vermengt. Nach Auffüllen mit T50 rotierte die Lösung bei 4°C über Nacht. Es erfolgte eine Abzentrifugation für 10 min mit 4000 g bei 4°C und ein Verwerfen des Überstands. Die beads wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und dieses mit 11.000 g für 30 s abzentrifugiert. Durch mehrmaliges Waschen des 50 ml Stammgefäßes mit T50 konnten alle beads überführt werden. Reste von Mediumlösung wurden entfernt, indem das Eppendorfgefäß mit T50 aufgefüllt, 5 min bei 4°C rotiert und mit 11.000 g für 30 s abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Eppendorfgefäß erneut mit T50 aufgefüllt und die Waschschritte insgesamt dreimal durchgeführt. Von den gereinigten beads wurden 1/20 für SDS-Gelkontrollen als Referenz vor Säureelution/Proteaseverdau verwendet. Hierzu wurden die beads mit 20 μl Probenpuffer versetzt und anschließend bei -20°C gelagert oder nach Aufkochen auf ein Gel aufgetragen.

2.9.3 Elution der IgG-Fusionsproteine von Protein A beads

Mittels Säureelution wurden die IgG-Proteinkonstrukte von den Protein A beads getrennt. Zu der Probe wurden 1,4 ml 100 mM Glyzinpuffer (pH 2,7) mit 150 mM NaCl (mit optional 5 mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂) gegeben und das 1,5 ml-Eppendorfgefäß über Nacht bei 4°C rotiert. Alternativ konnte die Elution auch in 500 μl-Eppendorfgefäßen stattfinden, hierbei wurde ein 100 mM Glyzinpuffer (pH 1,8-2) mit 150 mM NaCl und 5 mM CaCl₂ sowie 1 mM MgCl₂

verwendet. In diesem Fall wurde der Überstand nach 30 min- 1 h abgenommen, der pH mit der gleichen Menge an 1 M Tris pH 9,0 ausgeglichen und neuer Glyzinpuffer auf die beads aufgeschichtet. Eine abweichende Behandlung erhielt Nlgn Δ B mit der Schnittstelle für die Protease 3C (s.u.). Nach der Elution standen für die Umpufferung und Aufkonzentration verschiedene Methoden zur Verfügung:

2.9.4 Aufkonzentration mit Amicon Ultra-4 Zentrifugen Filter

Die eluierte Probe wurde 30 s bei 11.000 g abzentrifugiert und der Überstand in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. In dieses wurde das Volumen der Probe an 1 M Tris pH 9,0 zur pH-Neutralisation gegeben und das Gefäß für einige Minuten bei 4°C rotiert. Die beads wurden zweimal für je mindestens 5 min mit Glyzinpuffer erneut eluiert und der Überstand in angegebener Weise behandelt. Der Amicon-Zentrifugenfilter wurde zunächst in einem Zentrifugenlauf ohne Proteinlösung für 45 min mit 4.000 g bei 4°C mit dem Laufpuffer T50 mit 5 mM CaCl₂ und 80 mM NaCl äquilibriert. Nach Vorlegen von 300 μ l 1 M Tris pH 7,5 in das Amicon-Gefäß erfolgte die Zentrifugation der Proteinlösung mit 4000 g für 1 h bei 4°C bis zur Einengung auf 200 μ l. Die Zentrifugation wurde bis zur vollständigen Überführung der gesamten Proteinlösung in das Amicon wiederholt. Zum Pufferwechsel wurden 2 ml T50 mit 80 mM NaCl und 5 mM CaCl₂ in das Amicon gegeben und mit 4000 g für 1-2 h bei 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt und der erhaltene Überstand in einem Eppendorfgefäß bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.9.5 Aufkonzentration mit UPPA-Protein Konzentrations-Kit

Kit: UPPA-Protein Konzentrations-Kit Micro (G-Biosciences, #786-120)

Lösungen: UPPA I, UPPA II, OrgoSol-Puffer, UPC-Waschlösung, SEED, Lösungspuffer I, Lösungspuffer II

Zur Aufkonzentration mit dem UPPA-Protein Konzentrations-Kit der Fa. G-Biosciences wurde das Eluat in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und dort mit 2 μ l 1 M Tris pH 7,5 versetzt, um den sauren pH-Wert abzupuffern. Zu dem Volumen der Proteinlösung wurde das dreifache Volumen an UPPA-I hinzugefügt. Die Lösung wurde gevortext und für 10-15 min auf Eis gestellt. Danach wurde das dreifache Volumen der ursprünglichen Proteinlösung an UPPA-II hinzugefügt und die Lösung durch Zentrifugation mit 15.000 g für 5 min bei 4°C pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgte eine Zentrifugation für 30 s und ein erneutes Entfernen des Überstandes. Zur Reinigung wurden mindestens 40 μ l UPC-Waschlösung (bei größeren

Proben, das 3-4 fache des Pelletvolumens an Waschlösung) auf das Pellet gegeben und die Probe anschließend für 5 min mit 15.000 g bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 25 µl dd H₂O oder bei größeren Proben ein Volumen, das dem Pelletvolumen entsprach, auf das Pellet geschichtet und kurz gevortext. Nun wurden für je 0,1-0,3 ml der ursprünglichen Proteinlösung 1 ml OrgoSol Puffer und 5 µl SEED hinzugegeben. Wasser und OrgoSol-Puffer mussten dabei ein Verhältnis von 1:10 aufweisen. Die Probe wurde gevortext bis das Pellet eine Suspension mit dem OrgoSol Puffer bildete. Anschließend wurde sie für 30 min bei -20°C inkubiert, bei regelmäßigem Vortexen alle 5 min für 20-30 s bei 4°C. Im Anschluss wurde das Eppendorfgefäß mit 15.000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde für ca. 1 h luftgetrocknet, anschließend im Laufpuffer für die SPR-Messung aufgelöst und bei 4°C bis zur Messung gelagert.

Alternativ konnte das Pellet auch mittels der Lösungspuffer I und II aufgelöst werden. Dazu wurde das Pellet mit 5-50 µl des Lösungspuffers-I versetzt, kurz gevortext und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Hinzufügen von Lösungspuffer II (1/5 der Menge von Lösungspuffer I) erfolgte eine fünfminütige Inkubation und ein kurzes Abzentrifugieren. Die erhaltene Proteinlösung enthielt in diesem Stadium 60 mM Tris pH 7,0-7,5 und konnte umgepuffert werden.

2.9.6 Aufkonzentration mit Zeba Entsalzungs-Zentrifugen-Säule

Die Zeba Entsalzungs-Zentrifugen-Säulen (2 ml) der Fa. Thermo Scientific (# 89890) ermöglichten eine Aufkonzentration von Proben mit einem Volumen von 200-700 µl. Nach Säureelution und Abzentrifugation der Probe wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der saure pH-Wert durch Zugabe von 10 µl 1 M Tris pH 7,5 neutralisiert. Die Entsalzungs-Zentrifugen-Säule wurde in ein 14 ml Sammelgefäß platziert und 2 min mit 1.000 g bei 4°C zentrifugiert, um die Lagerungslösung der Säule zu entfernen. Nach Aufschichten von 1 ml Laufpuffer (T50 mit 80 mM NaCl und 5 mM CaCl₂) erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 1.000 g für 2 min bei 4°C. Dieser Schritt wurde insgesamt 3-4-mal durchgeführt und das Sammelgefäß nach jeder Zentrifugation geleert. Die Säule wurde in ein neues 14 ml Gefäß gesetzt und die Proteinlösung langsam oben auf die Säule gegeben. Zur Optimierung der Proteinrückgewinnung wurde bei einem Volumen unter 350 µl, 40 µl dd H₂O oder Laufpuffer aufgeschichtet. Die Säule wurde 2 min mit 1000 g bei 4°C zentrifugiert und die gewonnene Proteinlösung bis zur Messung bei 4°C gelagert.

2.9.7 Aufkonzentration mit PIERCE Konzentrador PES, 3k (88512)

Das PIERCE-Konzentratorsystem der Fa. Thermo Scientific wurde zur Einengung kleiner Volumina (bei Elution im 500 µl Eppendorfgefäß) genutzt. Es handelt sich um ein Filtrationssystem für Eppendorfgefäße, bei dem die Probe in eine zentrale Probenkammer gegeben und die Flüssigkeit durch eine Filtrationsmembran abgepresst wird.

Zunächst wurde das saure Eluat (s. 2.9.3 Elution der IgG-Fusionsproteine von Protein A beads) in ein neues Eppendorfgefäß überführt und dort mit dem gleichen Volumen an 1 M Tris pH 8/9 versetzt. Anschließend erfolgte die Reinigung des Filters des Konzentrationssystems, indem 500 µl Puffer auf die Membran gegeben wurden und 1 min mit 15.000 g bei 4°C zentrifugiert wurde. Das Filtrat und die restliche Flüssigkeit in der Probenkammer wurden verworfen und 100-500 µl der Probe aufgetragen. Die nachfolgende Zentrifugation für 2 min mit 15.000 g bei 4°C engte die Probenlösung auf ca. 100 µl ein. Erneut wurden 100-500 µl Lösung in die Probenkammer gegeben, bis zu einer Einengung auf 100 µl zentrifugiert und dieser Vorgang wiederholt, bis ein Gesamtvolumen von 100 µl-200 µl vorlag. Anschließend konnte die Probe aus der Probenkammer pipettiert werden und stand für einen Pufferwechsel zur Verfügung.

2.9.8 Pufferwechsel mit PUR-A-Lyzer (Fa. Sigma Aldrich)

Das PUR-A-Lyzer System der Fa. Sigma-Aldrich ermöglichte den Pufferaustausch über eine Dialysemembran. Zum Befeuchten der Membran wurde die Probenkammer mit 250 µl dd H₂O gefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Wasser verworfen, die Probe eingefüllt und das Dialysesystem in ein Gefäß mit dem 1000-fachen Volumen der Probe an Laufpuffer (T50, 5 mM CaCl₂, 80 mM NaCl) platziert. Unter ständigem Rühren erfolgte für mindestens 30 min der Pufferaustausch. Anschließend wurde der Laufpuffer erneuert und ein weiteres Mal für 30 min umgepuffert. Nach insgesamt dreimaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurde die Probe aus der Probenkammer in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.9.9 Aufbereitung von NlgnΔB mit Proteaseschnittstelle

NlgnΔB mit der Schnittstelle für die Protease 3C wurde nach der Reinigung der Protein A-beads in ein 500 µl Eppendorfgefäß überführt und mit 55 µl 10* HRV 3C Verdauungspuffer und 2 µl der Protease vermengt. Für den Proteaseverdau wurde die Probe über Nacht (16 h) bei 4°C rotiert und NlgnΔB aus dem IgG-Fusionskonstrukt an den beads herausgetrennt (s. Abb. 8). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die beads mit T50 gewaschen. Danach wurden die beads mit SDS-Probenpuffer versetzt und dienten zur Kontrolle des Verdau. Zum Überstand wurden 250 mM NaCl und 50 µl Ni-NTA beads hinzugefügt, die die

Protease durch Bindung an ihre His-Sequenz entfernten. Die Lösung wurde 30 min bis zu 2 h bei 4°C rotiert und danach für 30 s mit 11.000 g bei 4°C herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die His-beads noch einmal mit T50 für 5 min bei 4°C rotiert, um Proteinreste abzuwaschen. 10 µl des Überstands wurden mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und als Probe genommen. Der restliche Überstand wurde mit Hilfe der obengenannten Methoden umgepuffert und aufkonzentriert. Als Puffer für Nlgn wurde ein 50 mM Natrium-Acetatpuffer mit pH 2,0 gewählt. Sofern die Aufkonzentration mittels der Amicon Ultra Zentrifugenfilter erfolgte, wurde ein 5 mM Natrium-Acetatpuffer mit pH 7,0 verwendet, um Proteinverluste an der Filtermembran zu minimieren. Erst kurz vor der SPR-Messung wurde der pH-Wert in der fertigen Probe durch Zugabe von 50 mM Natrium-Acetatpuffer mit pH 2,0 abgesenkt.

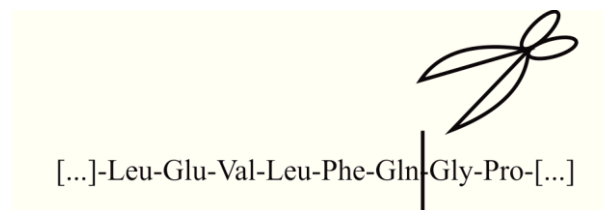


Abb. 8: Schnittstelle der Protease 3C des HRV. Die Protease trennt Nlgn vom IgG aus dem kombinierten Konstrukt (vertikale Linie) und setzt Nlgn in die Lösung frei. Weitere Einzelheiten siehe Text.

2.9.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Kontrolle der Aufreinigungsschritte in der Proteinaufbereitung (Laemmli, 1970).

Laufpuffer (10-fach):	0,25 M Tris, 1,9 M Glyzerin, pH 8,8; 1% SDS
Coomassiefärbelösung:	25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0,05 % Coomassie; für Schnellcoomassie: 45% Methanol, 10% Essigsäure, 4 Tabletten Coomassie
Entfärbelösung:	10% Essigsäure

Zunächst erfolgte die Mischung des Trenngels aus 1,75 ml dd H₂O mit 1,25 ml 4-fachem Lower Tris (1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4% SDS), 2 ml 30 % Acrylamidlösung, 15 µl 10% APS und 25 µl TEMED und anschließend das Einfüllen zwischen zwei Glasplatten. Eine Schicht aus 1-2 ml H₂O gesättigtem n-Butanol wurde zur Glättung des oberen Randes des Trenngels darüber gegossen und nach Polymerisation (1 h) mit dd H₂O gründlich abgespült. Das Sammelgel bestand aus 1,25 ml dd H₂O vermennt mit 0,5 ml 4-fachem Upper Tris (0,5 M Tris, pH 6,8,

0,4% SDS), 250 µl 30 % Acrylamidlösung, 12 µl 10% APS sowie 5 µl TEMED und wurde anschließend aufgeschichtet. Mithilfe eines Kammes zwischen den Glasplatten entstanden die Elektrophoresetaschen. Für dieses Gel dauerte die Polymerisation 10-20 min. Anschließend wurde der Kamm entfernt, das Gel in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad) installiert und diese mit 1-fach SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die Aufbereitung der Proben bestand aus dem Versetzen mit 2-fachem Probenpuffer, dem anschließenden Aufkochen im Heizblock für 3 min und bei Proben mit beads einer Zentrifugation von 1,5-2 min mit 11.000 g. Danach erfolgte das Einpipettieren in die Geltaschen. Der Elektrophoreselauf startete zunächst mit 80 V, die nach Übertreten der Proben in das Trenngel auf 100-120 V erhöht wurden.

Die Dauer der Elektrophorese lag im Mittel bei 2 h. Anschließend wurde das Trenngel vorsichtig aus der Elektrophoreseapparatur herausgelöst und in einer Coomassiefärbung für 1-2 h (Schnellcoomassie) oder über Nacht inkubiert. Schließlich fand die Entfärbung mittels Inkubation in 10% Essigsäure im Schüttler statt. Das fertige Coomassie-Gel wurde anschließend am Scanner dokumentiert und in Zellophanfolie eingeschlagen.

2.9.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Mithilfe des Spektrometers erfolgte die Konzentrationsbestimmung der messfertigen Proteinproben durch Bestimmung ihrer Absorption bei eingestrahltm Licht von 280 nm Wellenlänge. Der erhaltene Absorptionswert wurde in Relation zu einer BSA-Reihe im gleichen Puffer gesetzt und damit die Konzentration ermittelt. Zum Konzentrationsvergleich der Proben wurden zudem 5-10 µl der jeweiligen Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Bandendicke mithilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, USA) ausgewertet.

2.10 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Messungen

2.10.1 Physikalische Grundlagen der SPR

Die SPR nutzt das physikalische Phänomen der Totalreflektion zur Messung der Interaktion zwischen Ligand und Analyt (Piliarik et al., 2009; Willander et al., 2009). Im verwendeten Gerät SR7000DC der Fa. Reichert liegt eine Messanordnung nach Kretschmann (s. Abb. 9) vor, bei der sich der Messchip direkt auf der Basis eines Prismas mit hohem Brechungsindex befindet (Piliarik et al., 2009). Während der Messung wird monochromatisches Licht auf das Prisma eingestrahlt und am Übergang zwischen Prisma und Messchip total reflektiert (Homola, 2003; Piliarik et al., 2009). Die Photonen des Lichts treten in Interaktion mit den freien Elektronen des Metalls des Messchip und versetzen diese in synchrone Schwingungen (Oszillation; Willander

et al., 2009). Es entsteht eine elektromagnetische Welle (Oberflächenplasmon oder Oberflächenplasmonwelle, OP), die sich entlang der Chipoberfläche ausbreitet (Homola, 2003; Piliarik et al., 2009). Ihr elektromagnetisches Feld besitzt ein Maximum an der Grenze zwischen Metall und darüber liegender Chipmatrix/Flüssigkeit mit exponentieller Abnahme zu beiden Seiten hin (s. Abb. 9a; Homola, 2003; Piliarik et al., 2009; Willander et al., 2009). Das Phänomen der OP ist eindeutig messbar, denn die Einkopplung des Lichtstrahls erfolgt nur unter der Bedingung, dass gilt: $n_{ef} = n_p \cdot \sin \alpha$, mit n_p als Brechungsindex des Prismas, n_{ef} als effektiver Brechungsindex des Oberflächenplasmons und α als Einfallswinkel des Lichtstrahls auf den Metallfilm (Piliarik et al., 2009). Durch die Einkopplung nimmt die Intensität des reflektierten Lichtstrahls ab, da eine Energieübertragung stattfindet (de Crescenzo, 2008; Piliarik et al., 2009).

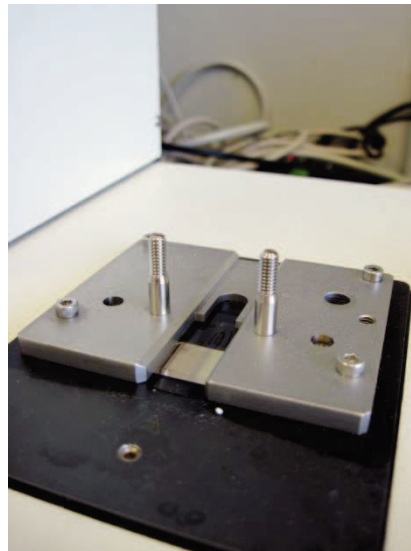
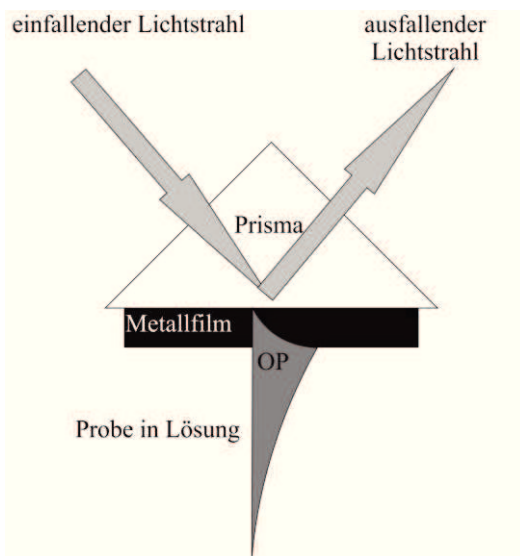


Abb.9a: Schematische Darstellung der SPR-Messanordnung nach (Piliarik et al., 2009).

In der Messanordnung nach Kretschmann liegt der Chip direkt auf dem Prisma auf. Das eingestrahlte Licht erzeugt die OP, die sich in der Probe ausdehnt. Weitere Details im Text.

Abb. 9b: Prismenoberfläche des SR7000DC mit aufliegendem Messchip.

Die Lichtquelle ist nicht sichtbar, da sie sich unter dem Prisma befindet. Während der Messung bedeckt eine Kunststoffkomponente die Chipoberfläche und teilt sie in zwei Abschnitte (Mess- und Signalkanal)

Wird nun ein definierter Lichtstrahl in einem seiner Parameter (Wellenlänge, Einfallswinkel, Lichtintensität, Phase, Polarisierung) verändert und die anderen beibehalten, so zeigen sich die OP-Bedingungen am reflektierten Lichtstrahl in Form eines lokalen Minimums (Piliarik et al., 2009; Willander et al., 2009). Während des Experiments bindet der Analyt an den Liganden, sodass sich der Brechungsindex der Lösung ändert (Homola, 2003; Willander et al., 2009). Dies beeinflusst das elektromagnetische Feld der OP, das sich auf die Lösung konzentriert und

entsprechend ändern sich die Bedingungen für die Einkopplung in die SPR mit der Folge eines verschobenen Reflektionsminimums (Homola, 2003; Piliarik et al., 2009; Willander et al., 2009).

Für die Auswertung der SPR-Experimente müssen zusätzlich zu den in 1.7 (SPR-Technologie als Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen) eingeführten Gleichungen I und II noch Formeln dargelegt werden. Ein Maß für das Verhältnis von Assoziation zu Dissoziation ist die Dissoziationskonstante K_d , für die gilt (Bell, 1988, S. 393 f.; Kastritis et al., 2013):

$$(III) \quad K_d = k_d / k_a = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$$

Die Bezeichnungen [A] und [B] stehen jeweils für die freie Konzentration des Liganden bzw. des Analyten im Gleichgewicht (Bell, 1988, ebd.). Wiederum sind k_a und k_d als Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation bzw. Dissoziation definiert und AB bezeichnet den aus A und B gebildeten Komplex (O'Shannessy, 1994; Van Regenmortel, 1994). Unter der Voraussetzung, dass für die Gesamtkonzentration des Liganden $[B_t]$ gilt, dass $[B_t] = [B] + [AB]$, lässt sich Gleichung III zur Scatchard- Gleichung umformen (Bell, 1988, ebd.):

$$(IV) \quad [AB] = [B_t] - \frac{K_d \cdot [AB]}{[A]}$$

Die grafische Auftragung dieser Gleichung in einem Diagramm (Scatchard-Diagramm), mit [AB] auf der y-Achse und $[AB]/[A]$ auf der x-Achse, liefert eine Gerade mit der Steigung $-K_d$ (Bell, 1988, S. 393f.).

2.10.2 Ablauf der SPR-Messung

Die durchgeführten SPR-Messungen adaptierten das von Johnsson beschriebene Protokoll für die Messung der Oberflächenresonanz auf einem mit CMD modifizierten Goldchip (Johnsson et al., 1991). Nlgn wurde kovalent auf dem Chip gebunden. Von Nrnx wurden jeweils 10 Konzentrationen erstellt und diese der Sättigung angenähert.

Chemikalien: 250 ml dd H₂O (entgast), 250 ml 50 mM Tris mit 5 mM CaCl₂ und 80 mM NaCl (entgast), 1,5 ml Desorb 1 (0,5% SDS, Xantec bioanalytics), 1,5 ml Desorb 2 (50 mM Glyzin pH 8,5, Xantec bioanalytics, mit Desorb 1 als K D-500), 100% Ethanol, Immersionsöl (Cargille Typ A #16482), 50% Ethanol, 1%-Triton X-100, 1,5 ml Borat-Elutionspuffer (1 M NaCl, 0,1 M Natriumborat pH 9,0, Xantec bioanalytics), 1 ml Nivellierungspuffer (1 M Ethanolamin*HCl pH 8,5, Xantec bioanalytics), 1 ml Aktivierungspuffer (100 mM N-Hydroxysuccinimid, 50 mM 2-(N-morpholino)Ethansulfonsäure pH 5,3, Xantec bioanalytics), EDC*HCl (Xantec, bioanalytics, zusammen mit Elutions-, Aktivierungs- und Nivellierungspuffer K AN-50), 50 mM Tris mit 350 mM EDTA und 1 M NaCl

Vor Beginn jeder SPR-Messung wurde zunächst die Apparatur mit 1,5 ml SDS (Desorb 1) gespült, um zurückgebliebene Proteinreste zu entfernen. Das SDS wurde anschließend mit 1,5 ml Glyzinpuffer (Desorb 2) neutralisiert. Danach wurde der benutzte Chip entfernt und die Prismenoberfläche mit 1 ml 100% Ethanol auf einem weichen Tuch vorsichtig gereinigt. Komponenten des Geräts in Kontakt zu den Flusszellen wurden in 1% Triton X-100 5 min inkubiert und mit dd H₂O gespült. Nachfolgend wurde 1 µl Immersionsöl auf die Prismenoberfläche aufgetragen und der Messchip mit nach oben weisender CMD-Matrix daraufgelegt. Anschließend wurde die Flusskammer bei einer Rate von 500 µl/min gespült, um Luftblasen zu entfernen. Die Chipoberfläche wurde mit 1,5 ml 50% Ethanol und 1,5 ml Natriumborat (Borat-Elutionspuffer) gereinigt. Die Aktivierung erfolgte mit einer Lösung aus 1 ml Aktivierungspuffer und 1 mM EDC*NHS. Der Ligand wurde retrograd über die Kleinvolumeninjektion in die linke der beiden Flusskammern überführt (Signalkanal). Nach Immobilisation der gewünschten Menge wurde die Messzelle von der Pumpe getrennt und ein Durchfluss von 50 µl/min eingestellt, der 3-5 min lang verworfen wurde. Außerdem wurde nach dem Wiederverbinden von Pumpe und Messzelle die Flussrate auf 500 µl/min gesetzt und der Durchfluss erneut für 3-5 min verworfen. Als Nächstes wurde die Flussverbindung zwischen Referenz- und Signalkanal wiederhergestellt und die Oberfläche mithilfe des Nivellierungspuffers inaktiviert. Danach folgte der Pufferwechsel auf den entgasten Laufpuffer T50 mit 5 mM CaCl₂ und 80 mM NaCl.

2.10.3 Experimentelles Design der SPR-Messung

Die SPR-Messungen bestanden aus einer Injektion der Probe für 5 min bei einer Flussrate von 50 µl/min und einer anschließenden Dissoziation bei gleicher Flussrate für 10 min, in der nur Laufpuffer injiziert wurde. Gemäß den Angaben der Fa. Reichert wurde für x Injektionen eine

Probenmenge von 650 μl + (x-1)*350 μl verwendet. In der Regel bestand die Konzentrationsreihe aus untenstehenden Verdünnungen, die jeweils zweimal, d.h. als Duplikat, aufgebracht wurden (s. Tabelle 1).

Injektion	Probenmenge (x/ml Puffer)
1	0,5 μl auf 1 ml
2	1 μl auf 1 ml
3	2 μl auf 1 ml
4	5 μl auf 1 ml
5	10 μl auf 1 ml
6	20 μl auf 1 ml
7	40 μl auf 1 ml
8	70 μl auf 1 ml
9	90 μl auf 1 ml
10	100 μl auf 1 ml

Tabelle 1: Verdünnungen für die einzelnen Injektionen

Nachfolgend wurde 10 s lang mit einer EDTA-Lösung gespült und die Chipoberfläche dadurch regeneriert.

2.10.4 Auswertung der Messdaten

Die erhaltenen Signalstärken wurden mithilfe des Programms Scrubber v2.0 (BioLogic Software Pty. Ltd.) ausgewertet. Die Sensogramme und Scatchard-Diagramme entstanden mithilfe von Microsoft Excel 2007.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Vorbereitung der kompetenten Zellen

Zur Vorbereitung der Bakterienzellen (*E. coli*) erfolgte die Aussaat auf einer LB-Agarplatte mit Tetrazyklin-Zusatz und die Inkubation bei 37°C als Übernachtskultur. Hiervon wurde eine Bakterienkolonie in 50 ml LB-Flüssigmedium überführt, das anschließend über Nacht bei 37°C im Bakterienrührer inkubiert. Aus dieser Bakterienkultur wurden 10 ml zu 1 l frischem LB-Medium hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 3-5 h mit 250 rpm bei 37°C im Bakterienrührer fand eine photometrische Wachstumskontrolle der Bakterienkultur statt, die bei gutem Wachstum eine Extinktion von 0,6-0,7 bei 600 nm Wellenlänge aufwies. Die Lösung wurde 15 min mit 4000 rpm in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C (SLA-1500) pelletiert, der Überstand verworfen und 1 l eiskaltes 10% Glycerol hinzugefügt. Die

Zentrifugation, das Verwerfen des Überstandes und das Lösen in 10% Glycerol, wurden sukzessive mit 500 ml, 250 ml und 4 ml Glycerol wiederholt, die finale Zellsuspension zu je 40 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.11.2 Elektrotransformation

Die unter 2.11.1 (Vorbereitung der kompetenten Zellen) beschriebenen kompetenten Zellen tauten zunächst auf Eis an. Eine 1:1000 Verdünnungslösung der gewünschten DNA wurde erstellt und 4 µl dieser Lösung zu 40 µl der kompetenten Zellen gegeben. Nach Überführung in eine kalte Küvette und einer Inkubation von ca. 1 min auf Eis schloss sich die Elektrotransformation mit 2,5 kV an. Die transformierte Bakteriensuspension wurde mit 1 ml LB-Medium versetzt und im Bakterienrührer für 1 h mit 250 rpm bei 37°C durchmischt. Von der Bakteriensuspension wurden 20-50 µl auf einer LB-Ampicillin –Platte ausplattiert, die bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubierte. Eine der Kolonien wurde aspiriert und als Vorkultur in 5 ml LB-Medium für 6-8 h schüttelnd inkubiert. Bei ausreichendem Wachstum wurden 500 µl der Vorkultur abpipettiert und zu 500 ml LB-Medium gegeben. Anschließend folgte die Inkubation dieser Bakterienkultur bei 37° über Nacht.

2.11.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA („Maxi-Prep“)

Das NucleoBond PC 500-Kit (#740574.50 Macherey-Nagel) ermöglichte die Aufreinigung der, von den Bakterienzellen (s. 2.11.2 Elektrotransformation) amplifizierten, DNA in einem mehrschrittigen Prozess. Wesentliche Schritte dieses Prozesses sind: die Lyse der Bakterienzellen zur Entfernung von extranukleärer DNA und Proteinen, die Purifikation auf einer Reinigungssäule, die Präzipitation der gereinigten DNA mit Isopropanol, die Entfernung von Salzen mittels Ethanol und das Lösen der gereinigten DNA in Tris/EDTA-Puffer.

Zunächst erfolgte eine Zentrifugation der Bakterienkultur für 15 min mit 6000 g bei 4°C zur Gewinnung eines Zellpellets. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 12 ml gekühlter S1-Puffer und 12 ml S2-Puffer hinzugefügt und die Probenröhrchen wiederholt invertiert. Es folgte eine Inkubation bei RT für 2-3 min und das Hinzufügen von 12 ml Neutralisierungspuffer S3. Hieran schloss sich eine Inkubation der Probe auf Eis für 5 min an. Diese wurde dann mit 12.000 g für 40 min bei 4°C (SS-34 Rotor) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Vor der weiteren Aufbereitung der Probe fand die Äquilibration der Reinigungssäule mit 6 ml N2-Puffer statt. Der Überstand der Proben floss durch einen dd H₂O-gespülten Whatmann-Filter auf die Säule und band an diese. Mithilfe von 32 ml N3 wurde die Säule gespült und die DNA dadurch gereinigt. Anschließend erfolgte die Rückgewinnung der DNA durch Elution mit 15 ml Puffer N5, das Vermengen der Probe mit 11 ml Isopropanol und eine Zentrifugation mit 15.000 g 30 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Es entstand ein weißliches Pellet, das mit 1-

2 ml 70% Ethanol versetzt, kurz gevortext und bei 15.000 g für 10 min bei RT zentrifugiert wurde. Auch dieser Überstand wurde verworfen. Zur Entfernung von Ethanolrückständen schloss sich eine Lufttrocknung bei RT an. Zuletzt wurde das Pellet in 0,5 ml Tris/EDTA-Puffer gelöst und die Konzentration im Photometer gemessen. Die reine DNA-Lösung lagerte bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank.

2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Kontrolle der Reinheit der erhaltenen cDNA.

Zur Herstellung des Gels wurden zunächst 0,56 g Agarose mit 70 ml Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,08% Essigsäure, pH 8,5) vermischt und unter gelegentlichem Schütteln in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich eine homogene Flüssigkeit ergab. Die Flüssigkeit wurde unter Rühren abgekühlt und nach Erreichen einer Temperatur von 30-40°C mit 7 µl Ethidiumbromid versetzt. Es folgte das Eingießen des Gels in eine Flachbett-Elektrophoresekammer mit anschließender Polymerisation von 30 min. Zu den DNA-Proben wurde der 10-fach Ladepuffer (100 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 57% Glycerin) hinzugefügt und diese anschließend in die Geltaschen einpipettiert. Für eine Dauer von 30-45 min wurden 80 V für den Lauf angelegt. Abschließend erfolgte die Dokumentation der Ergebnisse mithilfe eines UV-Kamerasystems.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht die Interaktion zwischen Nrnx und Nlgn unter Verwendung der SPR-Technologie und konzentriert sich hierbei auf die Auswirkung einer β -spezifischen Sequenz. Im Mittelpunkt der Experimente steht eine vergleichende Messung zwischen der LNS6, die diese Sequenz nicht enthält und dem vollständigen extrazellulären Anteil des β -Nrnx. Vor der Durchführung der Experimente zu Nrnx und Nlgn mussten verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein: 1) Die beiden Bindungspartner mussten in reinen und aufkonzentrierten Proteinlösungen vorliegen. 2) Mittels der SPR-Methode sollte eine Protein-Protein-Interaktion präzise messbar sein. 3) Nlgn durfte ausschließlich auf dem Messkanal immobilisiert sein. Diese Bedingungen wurden zunächst überprüft und anschließend die Messungen durchgeführt. Neben dem bereits erwähnten Vergleich zwischen der LNS6 inklusive oder exklusive β -spezifischer Sequenz in Interaktion mit Nlgn fand eine Untersuchung der Bindungseigenschaften von α -Nrnx statt.

3.1 Aufreinigung der Nrnx- und Nlgn-Konstrukte

Zur Erfüllung der eingangs erwähnten ersten Voraussetzung, d.h. der Aufreinigung der Proteinkonstrukte in ausreichender Menge, wurden HEK293-Zellen mit rekombinanter DNA transfiziert, der Überstand nach drei Tagen geerntet und in einem mehrschrittigen Aufreinigungsprozess vorbereitet (Details im Material- und Methodenteil). Die Kontrolle der Reinheit und Menge der Proteinprodukte erfolgte durch Gelelektrophorese. Dazu wurden für die einzelnen Aufreinigungsschritte und das Endprodukt Proben abgenommen, mit Probenpuffer versetzt, auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Anschließend wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Blau angefärbt. Außerdem wurden zur Kontrolle der korrekten Aufreinigung Proteinproben mit bekanntem Molekulargewicht (Standard) aufgetragen, die mitwanderten. Für Nlgn ohne Spleißefügung B (Nlgn Δ B) wurden die folgenden Schritte des Aufreinigungsprozesses dokumentiert: die Protein A beads nach Proteaseverdau, die Ni-NTA-beads sowie der Überstand auf den Ni-NTA-beads („Verdau“) (s. Abb. 10). Nach dem Proteaseverdau besitzt Nlgn Δ B ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa, das auf der Linie der Protein A beads und des Verdau deutlich erkennbar ist. Insofern war die Aufreinigung einer reinen Nlgn Δ B-Lösung in ausreichender Menge möglich. Des Weiteren zeigt sich in der Linie der Protein A beads eine schmale Bande von 150 kDa, die die verbleibenden Nlgn Δ B-IgG Konstrukte anzeigt, eine starke Bande zwischen 25 und 37 kDa (IgG) und eine schwache Bande zwischen 50 und 75 kDa (IgG-Dimere). Diese Beimischungen von IgG sind in den folgenden Aufreinigungsschritten nicht mehr vorhanden und sind daher für

die spätere Messung nicht relevant. In den Linien der Protein A und der Ni-NTA-beads stellt sich zudem eine Bande bei 22 kDa dar, die die Protease anzeigt.

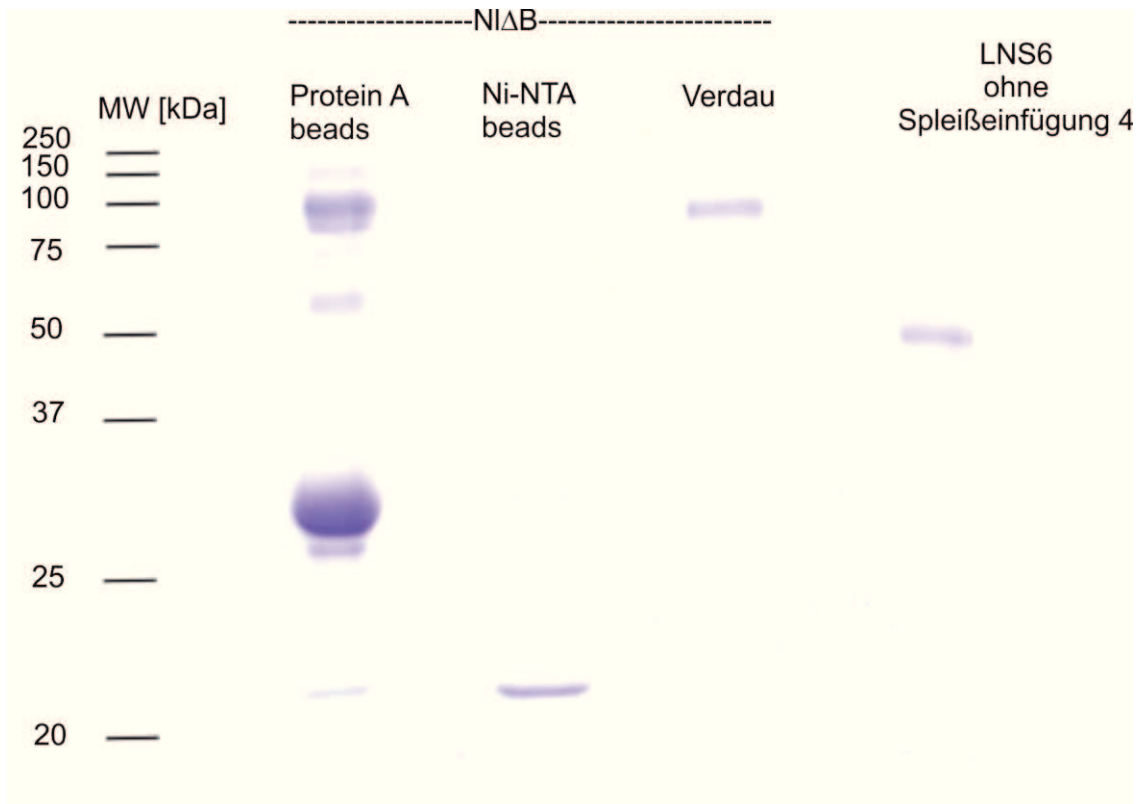


Abb. 10: Kontrolle der Proteinaufbereitung von Nlgn und Nrnx mithilfe der SDS-Gelelektrophorese (Coomassiefärbung). Für Nlgn Δ B wurden Proben von folgenden Schritten der Aufbereitung aufgetragen: Protein A beads nach Verdau, Ni-NTA beads nach Bindung an die Protease und Proteinlösung über den Ni-NTA beads („Verdau“). Die Linie ganz rechts zeigt das Endprodukt einer Aufreinigung der LNS6.

Im Überstand der Ni-NTA beads ist sie nicht mehr vorhanden, sodass sie erfolgreich aus der Lösung entfernt wurde. Neben den Aufreinigungsschritten für Nlgn findet sich auf diesem Gel auch eine Probe der LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 (s. Abb. 10, Linie ganz rechts), die die Reinheit des Endproduktes anzeigt, das bei ca. 50 kDa liegt.

Auch für die Nrnx-Konstrukte wurde die SDS-Gelelektrophorese zur Produktkontrolle eingesetzt (s. Abb. 11). Dazu wurden 10 μ l für LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 und 10 μ l für β -Nrnx ohne Spleißeinfügung 4 aufgetragen. Jede dieser Banden ist eindeutig erkennbar und zeigt zudem die Reinheit der entsprechenden Probe. Eine weitere SDS-Gelelektrophorese wurde zur Kontrolle der Aufbereitung des α -Nrnx durchgeführt (s. Abb. 12). Hierzu wurden 5 μ l des gereinigten Produktes sowie die Protein A beads nach Elution eingesetzt, um die Vollständigkeit

der Ablösung zu überprüfen. In der Linie der Protein A beads ist eine unvollständige Elution erkennbar, da noch Protein auf den beads zurückgeblieben ist. Auf der Linie des Endprodukts ist eine schwache Bande vorhanden; dies ist ein Zeichen für eine erfolgreiche Aufreinigung. Im Vergleich zu den anderen Aufbereitungen (s. Abb. 10,11) ist die Menge des gewonnenen Proteins deutlich geringer, obwohl mit dem Überstand von 120 10 cm-HEK293 Platten mehr als die vier-fünffache Menge an Zellen zur Herstellung verwendet wurde. Insofern erfordert die SPR-Messung mit α -Nr_{xn} einen hohen Materialaufwand. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die im Material- und Methodenteil beschriebenen Methoden der Proteinaufbereitung die Herstellung reiner Nr_{xn}- und Nlgn-Lösungen in ausreichender Menge ermöglichten.

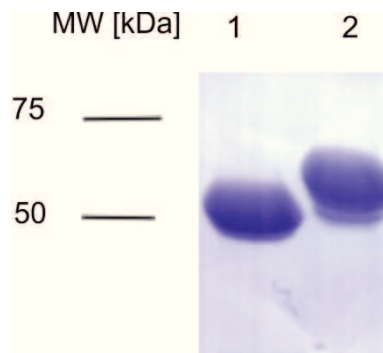


Abb. 11: Kontrolle der Proteinaufbereitung der Nr_{xn}-Konstrukte mithilfe der SDS-Gelelektrophorese (Coomassiefärbung). Auf das Gel wurden die LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 (1) sowie die extrazelluläre Domäne des β -Nr_{xn} ohne Spleißeinfügung 4 (2) aufgetragen. Hierbei wurden jeweils 10 μ l eingesetzt.

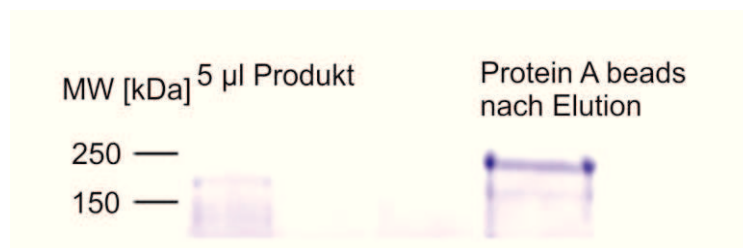


Abb. 12: Kontrolle der Proteinaufbereitung einer α -Nr_{xn} Probe mittels SDS-Gelelektrophorese (Coomassiefärbung). Auf das Gel wurden 5 μ l des fertigen Produktes nach Aufreinigung und Aufkonzentration gegeben (linke Linie) sowie die Protein A beads nach Elution (rechts).

Im Vorfeld der Messungen interessierte mich zudem, ob die Beimischung von 1 mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) Vorteile aufweist. Einige der vorherigen SPR-Experimente zum Nrxn/Nlgn-Komplex verwendeten BSA im Laufpuffer (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010). Analog zu den gezeigten Proteinproben (Abb. 10-12) reinigte ich Nrxn- und Nlgn-Proben auf und pufferte sie in einen Laufpuffer um, der neben T50, 5 mM CaCl₂, 80 mM NaCl auch 1 mg/ml BSA enthielt. Jedoch ließen sich in der, zur Kontrolle durchgeführten, SDS-Gelelektrophorese keine spezifischen Proteinbanden nachweisen, da sie durch BSA maskiert wurden. Außerdem schäumten die Proteinlösungen beim Entgasen vor der SPR-Messung stark auf und erzeugten so unerwünschte Luft. Auch die Probemessungen ergaben keine Hinweise auf Vorteile des BSA in der SPR. Aufgrund der genannten Nachteile wurde auf ein Hinzufügen von BSA zum Laufpuffer verzichtet. Die einzelnen Proteinlösungen lagen somit in reiner Form vor und konnten nun für SPR-Bindungsexperimente verwendet werden.

3.2 Spezifität des Bindungsassays

Die quantitative und qualitative Messung einer Protein-Protein-Interaktion erfordert einen Bindungsassay, der die Interaktion präzise detektiert. In dieser Arbeit wurde hierzu die SPR-Methode verwendet.

Als Test für die Spezifität der SPR-Methode wurden zunächst Interaktionen zwischen Antikörpern (AK) und den korrespondierenden Antigenen gemessen, da diese ein Beispiel für eine hochspezifische Bindung darstellen. In einem Experiment wählte ich die Bindung zwischen einem Anti-Kaninchen-AK und seinem Antigen (Kaninchenserum). Zur Vorbereitung des Versuchs wurden 10 µl Anti-Kaninchen-AK mit 40 µl 5 mM Natrium-Acetat-Lösung pH 5,0 vermengt und auf einem CMD-Chip immobilisiert. Hierauf wurde eine Mischung aus 25 µl Kaninchenserum und 475 µl des Laufpuffers (T50 pH 7,5; 5 mM CaCl₂; 80 mM NaCl) injiziert. Dies erzeugt einen deutlichen Signalanstieg von über 180 RU (s. Abb. 13) und weist damit eine Bindung zwischen Antigen und AK nach. Dementsprechend ist die SPR-Methode in der Lage eine hochaffine Protein-Protein-Interaktion mit einem großen Signalanstieg zu messen.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob auch an Nlgn auf dem Messchip eine spezifische Bindung möglich ist und diese präzise bestimmt werden kann. Diese Frage ist im Bezug auf die Nrxn/Nlgn-Interaktion von großer Bedeutung, da die Bindung nur dann korrekt gemessen wird, wenn Nlgn in ausreichender Konzentration vorliegt, das Protein intakt ist und auf dem Messchip so ausgerichtet ist, dass eine Komplexbildung möglich ist. Alle diese Aspekte lassen sich zusammenfassend in einem Experiment überprüfen, bei dem Anti-Nlgn 1-AK

(4C12) über einen Carboxymethyl-dextran (CMD)-Messchip mit nach Protokoll immobilisierten Nlgn injiziert wird. Des Weiteren überprüfte dieses Experiment, ob Nlgn exklusiv auf dem Messkanal immobilisiert wurde oder Fehl-immobilisationen auf dem Referenzkanal vorlagen. Letztgenannter Kanal sollte kein Protein enthalten, um als unspezifische Referenz vom Signal des Messkanals subtrahiert zu werden. Im Versuch wurde Nlgn auf einem CMD-Chip immobilisiert und eine 1:50 Verdünnung Nlgn-AK mit einem Volumen von 250 µl bei einer Flussrate von 50 µl/min injiziert. Das Sensogramm (s. Abb. 14) zeigt nach Injektion einen kontinuierlichen und deutlichen Signalanstieg auf über 100 RU als typisches Zeichen einer spezifischen Bindung. Hieraus ergaben sich zwei wichtige Erkenntnisse: 1) Nlgn liegt so auf dem Chip vor, dass andere Proteine, wie der Anti-Nlgn-AK, binden können. Dies zeigt die hohe Qualität der Immobilisation an und ist eine wesentliche Grundlage für die Messung der Nrxn/Nlgn-Interaktion. 2) Auch nach Subtraktion des Referenzkanals ergibt sich ein ansteigendes und selektives Bindungssignal. Insofern findet auf dem Referenzkanal keine wesentliche Bindung statt, die die Messdaten kontaminiert.

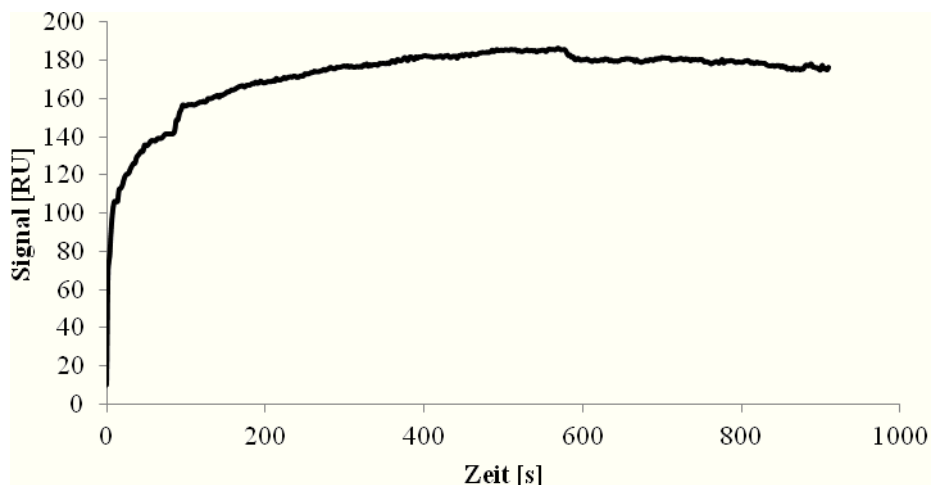


Abb. 13: Test für die Spezifität des SPR-Bindungsassays. Das Sensogramm zeichnet das SPR-Signal in RU in Abhängigkeit von der Zeit auf. Die Abb. zeigt die Interaktion zwischen immobilisiertem Anti-Kaninchen-AK und Kaninchenserum (1:20 Verdünnung). Der starke Signalanstieg auf über 150 RU weist auf eine spezifische Bindung hin.

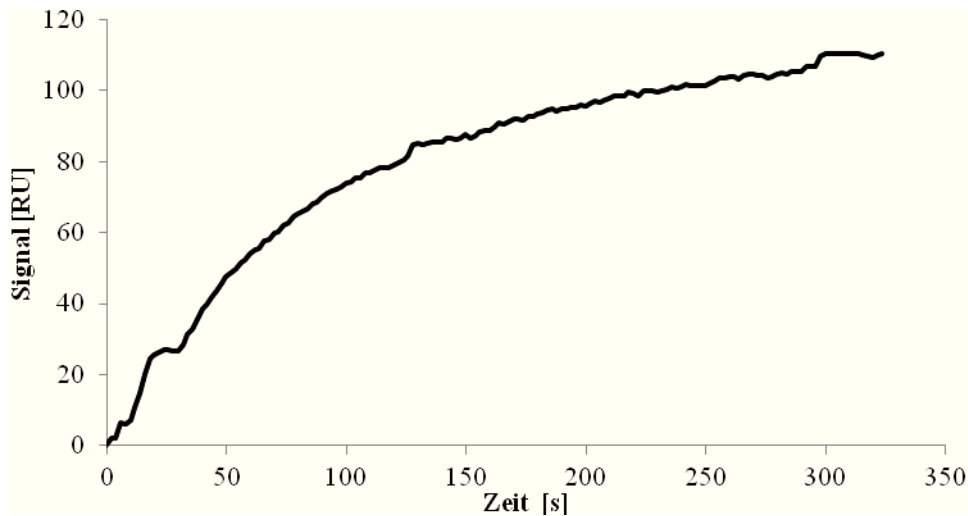


Abb. 14: Test der Spezifität der SPR am Beispiel der Interaktion zwischen Nlgn und Anti-Nlgn-AK. Das Sensogramm dokumentiert das SPR-Signal in Abhängigkeit von der Zeit. Nlgn wurde auf einem CMD-Chip immobilisiert und die Bindung des monoklonalen Anti-Nlgn1-AK (4C12; 1:50 Verdünnung) getestet. Die Kurve zeigt einen typischen Signalanstieg nach Injektion auf und weist damit eine spezifische Bindung nach.

Allerdings stellte die verwendete 1:50 Verdünnung des Anti-Nlgn-AK eine proteinreiche, hohe Verdünnung dar. Unklar war, ob auch geringere Konzentrationen des AK ein spezifisches Bindungssignal in der SPR-Messung ergeben. Um dies zu überprüfen, wurden eine 1:100 und eine 1:250 Anti-Nlgn-AK-Konzentration vorbereitet. Zunächst wurde erfolglos versucht den Messchip mittels der Injektion von NaCl in aufsteigender Konzentration (1 M; 2 M; 6,5 M) und anschließender Injektion von 1% Triton-Lösung zu regenerieren. Dies beeinträchtigt den Ablauf der folgenden Experimente jedoch nicht, da das Ziel der generelle Nachweis einer Interaktion zwischen Nlgn und dem Anti-Nlgn-AK und nicht eine Quantifizierung war. Sowohl die 1:100 als auch die 1:50 AK-Verdünnung wurden in einem Volumen von 250 μ l angesetzt und mit 50 μ l/min injiziert. Auch für diese Konzentrationen zeigt sich ein kontinuierlicher Signal-Anstieg von ca. 40 RU (1:100 Verdünnung) und von ca. 8 RU (1:250 Verdünnung) (s. Abb. 15), die als typische und spezifische Bindungssignale zu werten sind. Weiterhin fällt auf, dass das Signal der 1:50 Verdünnung größer ist als das der 1:100 Verdünnung, das wiederum über dem der 1:250 Verdünnung liegt. Insofern stellt die SPR-Methode nicht nur eine spezifische, sondern auch eine konzentrationsabhängige Messmethode dar, d.h. hohe Konzentrationen erzeugen hohe SPR-Signale, während niedrige Konzentrationen niedrige SPR-Signale erzielen. Einschränkend muss zu diesen Experimenten angemerkt werden, dass sich mit ihrer Hilfe keine K_d bestimmen lässt, da der Messchip zwischen den Messungen nicht (vollständig) regeneriert wurde.

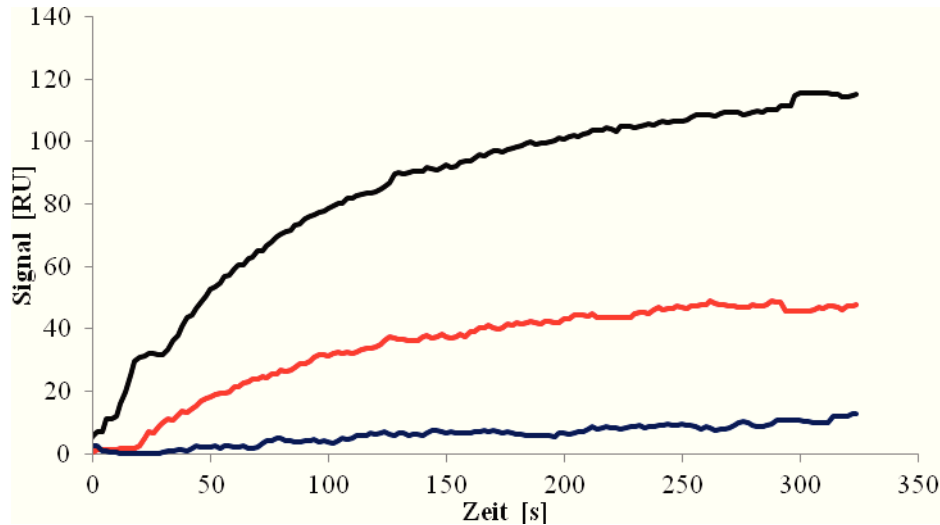


Abb. 15: Test der Spezifität der Interaktion zwischen Nlgn und Anti-Nlgn-AK mittels SPR. Das Sensogramm zeichnet das SPR-Signal in RU in Abhängigkeit von der Zeit auf. Die Abb. zeigt die Interaktion von immobilisiertem Nlgn auf einem CMD-Chip mit Anti-Nlgn1-AK in unterschiedlichen Verdünnungen. Es ist zu beachten, dass diese Abb. gegenüber Abb. 14 eine andere Nulllinie verwendet, sodass die SPR-Signale um 5 RU zunehmen. Schwarz: 1:50 Verdünnung, Rot: 1:100 Verdünnung, Blau: 1: 250 Verdünnung

Neben spezifischen Bindungssignalen in der SPR interessierten mich im Vorfeld der Nr_{xn}/Nlgn-Messungen auch Störeinflüsse, die dann vorliegen, wenn sich das SPR-Signal ändert, ohne dass eine Bindung stattfindet (Homola, 2003; Willander et al., 2009). Durch diese Veränderungen kann das Signal des Messkanals verfälscht oder maskiert werden, sodass sie möglichst vermieden werden sollten. Die durchgeführten Experimente überprüften Signalveränderungen durch Pufferinjektionen, um die Auswirkungen verschiedener Lösungen auf das SPR-Signal zu testen und die Messungen zu optimieren. Dazu wurde eine Probe aus 100 µl Glyzin pH 2,7 mit 900 µl Laufpuffer vermischt (T50 mit 5 mM CaCl₂ und 80 mM NaCl) und mittels eines vorprogrammierten Injektionsprotokolls injiziert. Dieses bestand aus einer Assoziationsphase von 3 min mit einer Flussrate von 50 µl/min, gefolgt von einer Dissoziationsphase von 5 min. Der Chip wurde anschließend mit einer Pufferinjektion von 500 µl gewaschen und mit einer Regenerationslösung aus T50 und 350 mM EDTA gespült. Für die Auswertung wurde der Referenzkanal subtrahiert. Die Messkurven zeigen zunächst einen steilen SPR-Signal-Abfall, der sich dann auf einem Plateau von ca. 12 RU stabilisiert und nach Ende der Injektion rasch wieder auf die Nulllinie zurückkehrt (s. Abb. 16 A).

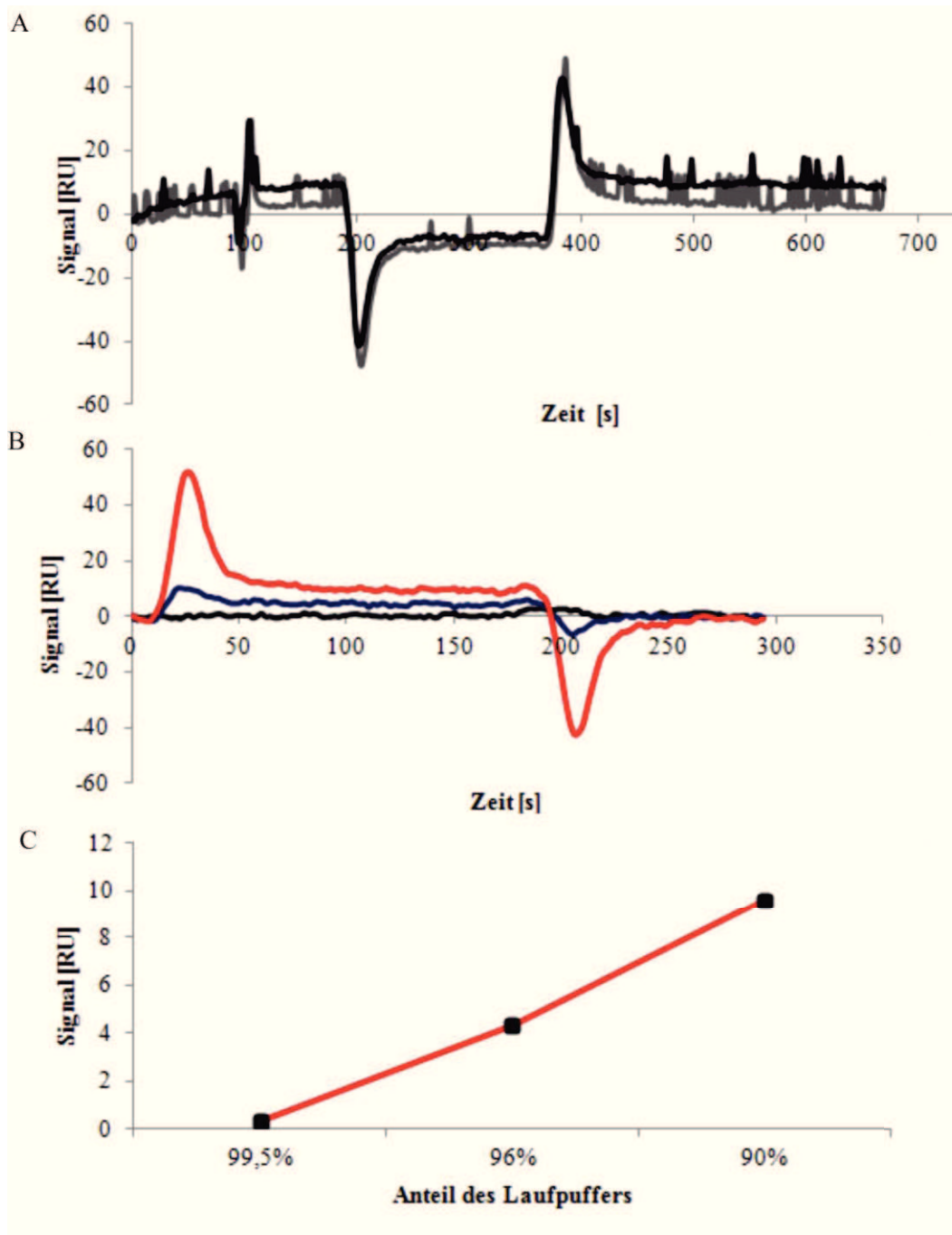


Abb. 16: Test zur Überprüfung von Störeinflüssen durch Glyzinpuffer und Wasser. A: Das Sensogramm zeigt das SPR-Signal in RU in Abhängigkeit von der Zeit. Injektion von zwei Proben aus 100 μ l Glyzinpuffer vermischt mit 900 μ l Laufpuffer. B: Sensogramm der Injektion von Wasserproben, Es wurden drei Proben Laufpuffer auf 1 ml mit unterschiedlich großen Mengen Wasser aufgefüllt: rot: 90% Laufpuffer, blau: 96% Laufpuffer, schwarz: 99,5% Laufpuffer; C: SPR-Signal in RU in Abhängigkeit vom Anteil des Laufpuffers in der Probe

Die Injektion eines anderen Puffers verändert das SPR-Signal somit messbar und kann das Signal des Messkanals verfälschen oder maskieren. Auch die Subtraktion des Referenzkanals kann dies nur teilweise kompensieren und es verbleibt eine Änderung von ca. 12 RU. Insofern ist eine Angleichung von Lauf- und Probenpuffer anzustreben (de Crescenzo, 2008; Jason-Moller et al., 2006; Myszka, 1997). Ergänzend stellte sich die Frage, ob bereits die Injektion von dd H₂O, das keine Ionen enthält, einen Einfluss auf die Messwerte hat. Im Folgenden prüfte ich die Hypothese, dass der Einfluss auf die RU-Werte nur durch andere Ionen im Laufpuffer zu Stande kommt und bei Wasser nicht auftreten sollte. Dazu wurden drei Proben injiziert, die auf einem Gesamtvolumen von 1 ml jeweils eine unterschiedliche Verdünnung mit dd H₂O enthielten (100 µl, 40 µl, 5 µl). Entsprechend betrug der Anteil des Laufpuffers in den Proben 90%, 96% und 99,5%. Nach Subtraktion des Referenzkanals ergab sich für die Proben mit 90% und 96% Laufpuffer ein ähnliches Bild: Das SPR-Signal steigt zunächst steil an und erreicht ein Plateau, das für die Injektion mit 90% Laufpuffer bei ca. 9-10 RU und für die Injektion mit 96% Laufpuffer bei ca. 4-5 RU liegt (s. Abb. 16 B). Nach Ende der Zuführung der Proben fällt das Signal steil ab und erreichte schnell wieder die Nulllinie. Die Injektion mit 99,5% Laufpuffer weist keinen eindeutigen SPR-Signalanstieg oder -abfall auf, sondern blieb nahe der Nulllinie. Vergleicht man die Plateaus der einzelnen Wasserinjektionen, so fällt auf, dass das Signal in RU nahezu linear mit zunehmender Verdünnung ansteigt (s. Abb. 16 C). Als Fazit dieser Experimente lässt sich formulieren, dass vom Laufpuffer divergierende Probenpuffer zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung des SPR-Signals führen. Pufferinhomogenitäten, z.B. durch Verdünnung der Proben mit dd H₂O, mussten daher vermieden werden. Jedoch weist die kleine Auswirkung der Beimischung von 5 µl dd H₂O darauf hin, dass geringe Pufferinhomogenitäten tolerabel sind. Die Erkenntnisse über spezifische Bindungen und Störeinflüsse in der SPR-Messung ermöglichten die Erarbeitung eines standardisierten Messprotokolls für die Affinitätsmessung des Nr_{xn}/Nl_{gn}-Komplexes, das im Folgenden Verwendung findet (s. Material- und Methodenteil).

3.3 Die LNS6 bindet spezifisch und hochaffin an NlgnΔB

Die bisher vorgestellten Experimente maßen Protein-Protein-Interaktionen zwischen hochaffinen Antikörpern und den jeweiligen Antigenen. Für die Fragestellung dieser Arbeit interessierte jedoch die Messung der Interaktion zwischen Nr_{xn} und Nl_{gn} und insbesondere etwaige Unterschiede zwischen der LNS6 mit oder ohne β-spezifische Sequenz. Ausgangspunkt für diesen Vergleich sollte ein Experiment zur Charakterisierung der LNS6 ohne Spleißefügung 4 in Bindung an NlgnΔB sein. Zum einen können beide Proteine leicht in ausreichender Menge hergestellt werden, zum anderen existieren zahlreiche Referenzdaten zu dieser Bindung in der Literatur (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010)

zur Beurteilung der Reliabilität der Ergebnisse. Nlgn Δ B wurde aufgereinigt, in 5 mM Natriumazetat pH 5,0 umgepuffert und retrograd mit der Kleinvolumeninjektion auf einen CMD-Chip aufgebracht (immobilisiert ca. 1900 RU). Abweichend vom im Material- und Methodenteil beschriebenen Protokoll wurde der Signalkanal vor dem Wiederanschließen der beiden Flusskanäle nur für einige Minuten mit dd H₂O gespült und nicht die Flusszelle von der Pumpe getrennt. Die LNS6 wurde in T50 mit 5 mM CaCl₂ umgepuffert, ihre Konzentration ermittelt und von der Proteinlösung 9 Verdünnungen in aufsteigender Konzentration erstellt. Diese enthielten auf einem Volumen von 1 ml jeweils ein unterschiedliches Volumen an LNS6 (0,5 μ l; 1 μ l; 2 μ l; 5 μ l; 10 μ l; 20 μ l; 40 μ l; 70 μ l; 90 μ l), das mit Laufpuffer (T50 mit 5 mM CaCl₂) aufgefüllt wurde. Die Konzentrationen der einzelnen Proben reichten von 5,8 nM bis 1049,4 nM. Während des Experiments wurden die Proben nacheinander injiziert, mit einer Injektionsphase von 5 min und einer Dissoziationsphase von 10 min. Anschließend erfolgte mit einer 10 s Injektion einer T50 und 350 mM EDTA-Lösung die Regeneration der Chipoberfläche, gefolgt von einer Nulllinie von 10 min. Jede der 10 Konzentrationen wurde als doppelte Injektion (Duplikatinjektion) aufgebracht, d.h. nach dem ersten Messzyklus schloß sich unmittelbar ein zweiter mit der gleichen Probe an. Zudem wurden in festen Abständen Leerproben als Referenzlösungen injiziert, die kein Protein enthielten, aber den gleichen Messzyklus durchliefen. Das SPR-Signal dieser Proben wurde subtrahiert, wie das des Referenzkanals, auf dem kein Protein immobilisiert war, um ein reines Bindungssignal zu erhalten („Prinzip der doppelten Referenz“; de Crescenzo, 2008; Rich et al., 2000; Van Regenmortel, 2003). Die Messung erfolgte bei 20 °C mit einer Schwankung von 0,054 °C. Das Sensogramm der einzelnen Proben zeigt einen steilen Signalanstieg innerhalb weniger Sekunden auf ein Plateau, das bis zum Ende der Injektionsphase (t=300 s) gehalten wird (s. Abb. 17 A). Anschließend fällt das Signal rasch wieder ab, erreicht aber nur bei den niedrigeren Konzentrationen die Nulllinie, während es bei höheren Konzentrationen in der Dissoziationsphase bis zu 10 RU beträgt. Höhere Proteinkonzentrationen erzeugen dabei stets ein höheres Bindungssignal. Fernerhin ist erkennbar, dass die Duplikatinjektionen, d.h. die Injektionen gleicher Konzentration, nahezu gleich hohe SPR-Signale erzeugen (s. Abb. 17 A, B). Zusammenfassend ergeben sich aus diesem Experiment folgende Beobachtungen: 1) die Bindung zwischen LNS6 und Nlgn Δ B ist spezifisch messbar und konzentrationsabhängig, da höhere Konzentrationen auch ein höheres SPR-Signal erzeugen. 2) Die SPR-Signale für die einzelnen Konzentrationen sind reproduzierbar. Aufeinanderfolgende Duplikatinjektionen erzeugen nahezu gleich hohe SPR-Signale.

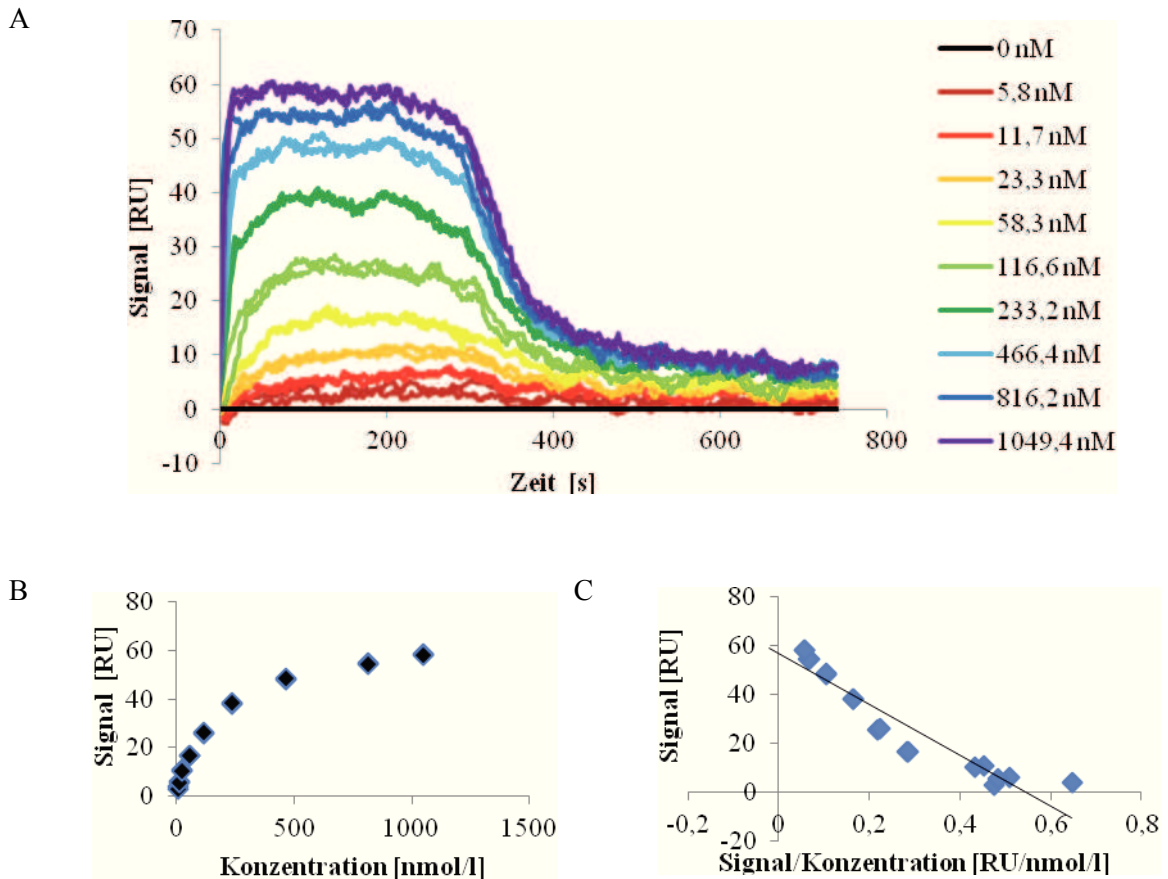


Abb. 17: SPR-Bindungsexperiment mit LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 und immobilisiertem Nlgn Δ B. A: Sensogramm der SPR-Messung. Nlgn wurde als Ligand auf einen CMD-Chip immobilisiert und die LNS6 in verschiedenen Konzentrationen injiziert; B: SPR-Signal in RU in Abhängigkeit von der Konzentration in nmol/l; C: Scatchard-Diagramm der Interaktion. y-Achse: Konzentration des gebildeten Nrxn/Nlgn-Komplexes in RU; x-Achse: Konzentration des gebildeten Nrxn/Nlgn-Komplexes in RU dividiert durch die Konzentration des Analyten.

Eine Kontrolle der Messwerte erfolgte mithilfe eines Scatchard-Diagramms, in dem auf der y-Achse die Konzentration des Nrxn/Nlgn-Komplexes und auf der x-Achse die Konzentration des Nrxn/Nlgn-Komplexes dividiert durch die Konzentration des Analyten (LNS6) aufgetragen wird (s. Abb. 17 C). In diesem Fall wird die Konzentration des Komplexes in RU angegeben, da das SPR-Signal proportional mit der Bildung des Komplexes ansteigt (s.o.) und die Konzentration des Analyten in nmol/l. Legt man in die Datenpunkte eine Ausgleichsgerade, so besitzt diese eine gute Annäherung an die Messwerte als Zeichen für eine spezifische, konzentrationsabhängige Bindung. Das Programm „Scrubber“ interpoliert mithilfe des Marquardt-Levenburg-Algorithmus eine nichtlineare Kurve für die Signalwerte der einzelnen

Konzentrationen. In Anlehnung an Gleichung (III) (s. 2.10.1 Physikalische Grundlagen der SPR) erhalte ich:

$$RU = \frac{RU_{\text{Max}} * [A]}{K_d + [A]}$$

Dabei bezeichnet K_d die Dissoziationskonstante im Gleichgewicht, RU das SPR-Signal, RU_{Max} das maximale SPR-Signal und $[A]$ die Konzentration des Analyten. Als RU wird jeweils der für die Konzentration $[A]$ erreichte Signalwert im Gleichgewichtszustand eingesetzt. Eine erste rechnerische Annäherung liefert Werte für RU_{Max} und K_d sowie die entsprechenden Messfehler nach der Methode der kleinsten Quadrate. Anschließend variiert das Programm RU_{Max} und K_d so lange, bis die Messfehler ein Minimum erreichen. Mithilfe dieses Verfahrens errechnet Scrubber für die Interaktion der LNS6 mit NlgnΔB einen K_d -Wert von $172 \text{ nM} \pm 2 \text{ nM}$.

Dieser Wert liegt innerhalb des Spektrums der Literaturreferenzen, die 16 nM (Leone et al., 2010), $206,9 \text{ nM}$ (Koehnke et al., 2008) und 845 nM (Koehnke et al., 2010) betragen. Das in dieser Arbeit verwendete Nlgn enthielt die Spleißefügung A, während die Spleißefügung B fehlte. Im Unterscheid hierzu war in den Referenzexperimenten teilweise auch die Spleißefügung A abwesend, dies hatte für Nlgn1 in SPR-Experimenten jedoch nur geringe Auswirkungen (Koehnke et al., 2010). In dieses Bild fügen sich Erkenntnisse aus Kristallstrukturen, nach denen sich die Konformation der benachbarten Aminosäurereste durch das Einfügen der Spleißefügung A nicht ändert (Tanaka et al., 2012).

Abschließend lässt sich somit feststellen, dass die Bindung zwischen Nlgn und der LNS6 mit nanomolarer Affinität erfolgt. Der hier gemessene K_d -Wert liegt im Bereich der Referenzen und kann als reliabel betrachtet werden. Insofern eignet sich das verwendete Protokoll für die Messung der Nrxn/Nlgn-Interaktion und kann in einem zweiten Schritt zum Vergleich zwischen der LNS6 mit und ohne β -spezifischer Sequenz eingesetzt werden.

3.4 Die β -spezifische Sequenz behindert die Bindung an Nlgn

Ausgehend von der Messung der LNS6 ohne Spleißefügung 4 auf dem Nlgn-Chip sollte nun ein Vergleich der Bindungseigenschaften der LNS6 mit denen des extrazellulären Anteils der β -Nrxn (LNS6 mit β -Nrxn spezifischer Sequenz) durchgeführt werden. Dies ist insofern interessant, da diese Sequenz ein exklusives Merkmal der β -Nrxn ist, ihre genaue Auswirkung bisher aber kaum untersucht wurde. Für das vollständige Verständnis der β -Nrxn/Nlgn-Interaktion ist die Beachtung auch kurzer AS-Sequenzen jedoch notwendig, wie das Beispiel der Spleißefügung 4 zeigt (s. 1.7 SPR-Technologie als Methode zur Analyse von Protein-Protein-

Interaktionen). Die Proteine LNS6 und β -Nrnx enthielten jeweils nicht die Spleißeinfügung 4, um Auswirkungen dieser Sequenz auszuschließen (s.o.). Die Aufreinigung der Nrnx-Konstrukte und des Nlgn Δ B gelang in ausreichender Menge. Nach der Umpufferung in 5 mM Natrium-Acetat pH 5,0 konnte Nlgn Δ B mittels Kleinvolumeninjektion retrograd auf einen CMD-Chip aufgebracht und dort mit ca. 1400 RU immobilisiert werden. Abweichend vom im Material- und Methodenteil beschriebenen Protokoll wurde bei diesem Experiment der Signalkanal vor dem Wiederanschießen der beiden Flusskanäle nur für einige Minuten mit dd H₂O gespült und nicht die Flusszelle von der Pumpe getrennt. Die beiden Nrnx-Konstrukte wurden in T50 mit 5 mM CaCl₂ umgepuffert und ihre Konzentrationen bestimmt. Von jedem Konstrukt wurden 10 Probenkonzentrationen erstellt, bei denen in einem Gesamtvolumen von 1 ml jeweils eine unterschiedlich große Menge Proteidlösung (0,5 μ l; 1 μ l; 2 μ l; 5 μ l; 10 μ l; 20 μ l; 40 μ l; 70 μ l; 90 μ l; 100 μ l) enthalten war und der Rest mit Laufpuffer (T50, 5 mM CaCl₂) aufgefüllt wurde. Die resultierenden Konzentrationen reichten von 2,7-541,8 nM für LNS6 und von 2,3-468,5 nM für β -Nrnx ohne Spleißeinfügung 4. Auch in diesem Experiment bestand der Injektionszyklus aus einer Injektionsphase von 5 min, einer Dissoziationsphase von 10 min, einem EDTA-Puls mit T50 und 350 mM EDTA zur Regeneration und einer anschließenden Nulllinie von 10 min. Dadurch wurden vergleichbare Bedingungen zur Messung der LNS6 (s.o.) erreicht. Analog hierzu wurden die einzelnen Proben als Duplikate injiziert und zudem in festen Abständen Leerproben eingebracht. Die Messung erfolgte bei 20 °C mit einer Schwankung von 0,054°C. Das SPR-Signal der LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 steigt erneut steil an (vgl. Abb. 17,18) und erreicht für die höheren Konzentrationen ein Plateau, das gegen Ende der Injektionsphase leicht abfällt (s. Abb. 18 A). Dagegen stellt sich bei den Injektionen geringerer Konzentrationen erst gegen Ende der Injektionsphase ein Gleichgewichtszustand ein oder gar nicht. Nach Ende der Injektionsphase fällt das SPR-Signal bei allen Konzentrationen deutlich ab, ohne auf die Nulllinie zurückzukehren. Dies lässt sich insbesondere bei den höheren Konzentrationen beobachten, die rasch auf 100 RU absinken und dann kontinuierlich weiter abfallen. Entsprechend weisen die Bindungskurven der LNS6 sowohl auf eine hohe Assoziations- als auch Dissoziationskonstante hin, als Erklärung für den raschen Anstieg und Abfall. Ein anderes Verhalten weist β -Nrnx ohne Spleißeinfügung 4 auf, dessen SPR-Signalanstieg in der Assoziationsphase deutlich langsamer erfolgt. Somit erreichen die Injektionen ihr Plateau erst gegen Ende der Injektionsphase und nicht bereits am Anfang wie bei der LNS6. Im Vergleich zur LNS6 fehlt außerdem ein deutlicher Abfall in der Dissoziationsphase. Zusammenfassend zeigt β -Nrnx eine langsamere Assoziation und Dissoziation, weshalb niedrigere Assoziations- und Dissoziationskonstanten vorliegen.

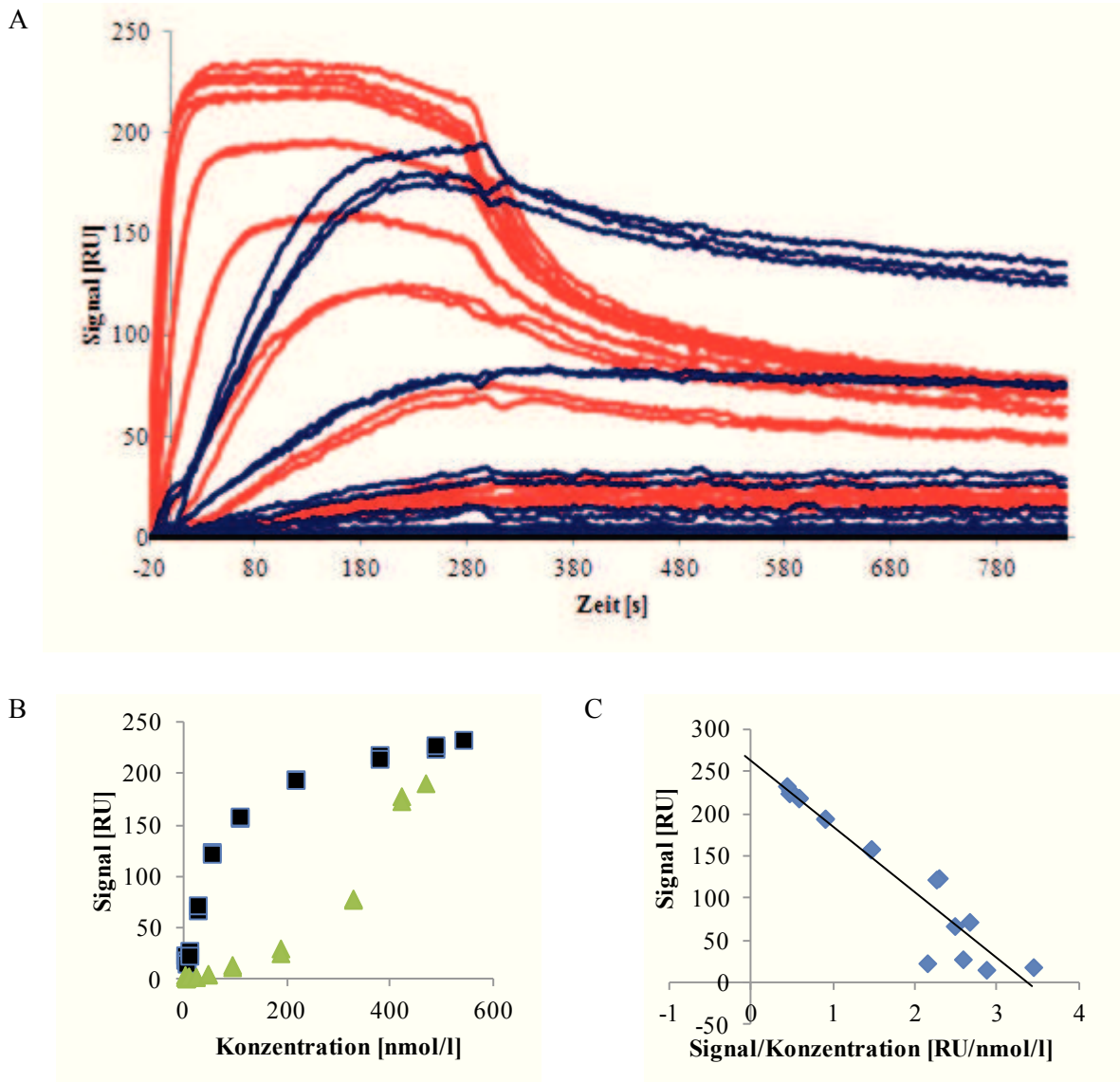


Abb. 18: SPR-Bindungsexperiment zum Vergleich der LNS6 mit der extrazellulären Domäne von β -Nrxn. A: Sensogramm der SPR-Messung der LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 (rot) und β -Nrxn ohne Spleißeinfügung 4 (blau) auf einem CMD-Chip mit immobilisiertem Nlgn. Gezeigt ist die Injektionsphase (bis ca. $t = 300$ s) und ein Teil der Dissoziationsphase der Messungen; B: SPR-Signal in RU in Abhängigkeit von der Konzentration. LNS6 dargestellt durch schwarze Quadrate, β -Nrxn dargestellt durch grüne Dreiecke; C: Scatchard-Diagramm der Interaktion zwischen der LNS6 und Nlgn Δ B. y-Achse: Konzentration des gebildeten Nrxn/Nlgn-Komplexes in RU; x-Achse: Konzentration des gebildeten Nrxn/Nlgn-Komplexes in RU dividiert durch die Konzentration des Analyten.

Trägt man die SPR-Signale des Gleichgewichtszustands in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Nrxn auf, erhält man für die LNS6 eine Bindungskurve, die sich einem

Maximum annähert (s. Abb. 18 B). Die Kurve für β -Nrnx liegt für alle Konzentrationen unterhalb der Kurve für die LNS6, nähert sich keinem Maximum an und ist somit ein weiteres Indiz für eine schlechtere Bindung. Für beide verwendeten Proteine steigt das Signal mit zunehmender Konzentration, sodass eine konzentrationsabhängige Komplexbildung vorliegt. Mithilfe eines Scatchard-Diagramms ergibt sich für die Interaktion der LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 mit Nlgn Δ B eine lineare Funktion als Zeichen einer spezifischen und konzentrationsabhängigen Bindung (s. Abb. 18 C). Auch hier ist auf der y-Achse die Konzentration des Nrnx/Nlgn-Komplexes in RU und auf der x-Achse der Quotient aus der Konzentration des Nrnx/Nlgn-Komplexes in RU dividiert durch die Konzentration des Nrnx in nmol/l aufgetragen (s. Abb. 18 C). Durch die starke Abweichung von den anderen Messwerten wurde die erste Duplikatinjektion von der Auswertung ausgeschlossen.

Aus der Gleichgewichtsphase lassen sich mithilfe von Scrubber die K_d -Werte als Maß für die Affinität interpolieren (s.o.). Für die LNS6 wurde aus den fünf höchsten Konzentrationen ein K_d -Wert von $72,4 \text{ nM} \pm 7 \text{ nM}$ ermittelt, während sich für β -Nrnx (alle Injektionen) $460 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ ergaben. Insofern erschwert die β -spezifische Sequenz die Bindung um das 6,4-fache und ist ein wesentlicher Störfaktor für die Komplexbildung. Wenn bereits die Sequenz aus 37 AS die Bindung zu Nlgn derart behindert, welche Auswirkung haben dann die zusätzlichen Domänen des α -Nrnx? Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Interaktion zwischen α -Nrnx und Nlgn Δ B in einem weiteren Experiment untersucht.

3.5 SPR-Messung der α -Nrnx mit Spleißeinfügung 4 auf einem Nlgn-Chip

Als Fortsetzung der bisherigen Experimente wurde nun eine Messung zwischen der kompletten extrazellulären Domäne des α -Nrnx mit Spleißeinfügung 4 und Nlgn Δ B durchgeführt. Für die Nrnx-Forschung ist die genaue Charakterisierung des α -Nrnx von großem Interesse, da α -Nrnx die Bindung an zahlreiche Partner ermöglicht und spezifische Funktionen vermittelt, die sich nicht durch β -Nrnx ersetzen lassen (s. 1.3 Nrnx als Organisatoren der Präsynapse). Obwohl diese Messung schon in einigen Arbeiten durchgeführt wurde (Boucard et al., 2005; Comoletti et al., 2010), gelang bisher keine Quantifizierung der K_d oder nur eine K_d -Bestimmung für ein unvollständiges α -Nrnx (Miller et al., 2011). Schwierigkeiten entstehen insbesondere durch die Größe des Proteinkonstrukts, das mit ca. 200 kDa viermal so schwer ist wie die LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 und daher bei der Aufreinigung besonders leicht an Filtermembranen hängenbleibt oder präzipitiert. Eine weitere Herausforderung besteht in der Herstellung ausreichender Mengen des Proteins, da die Transfektion in HEK293-Zellen nur eine geringe Ausbeute ergibt. Auch im Vorfeld dieser Messung erforderte die Aufreinigung des α -Nrnx eine hohen Zahl an HEK293-Zellen (s. Abb. 12). Dagegen konnte Nlgn Δ B in ausreichenden Mengen

aufgereinigt, auf einen CMD-Chip gebracht und dort immobilisiert werden (ca. 610 RU). Von der Proteinlösung des α -Nrxn wurden 9 Probenkonzentrationen erstellt, indem ein definiertes Volumen der Proteinlösung (0,5 μ l; 1 μ l; 2 μ l; 5 μ l; 10 μ l; 20 μ l; 70 μ l; 90 μ l; 100 μ l) mit Laufpuffer (T50, 5 mM CaCl₂, 80 mM NaCl) auf 1 ml aufgefüllt wurde. Diese Probenkonzentrationen wurden in einer Injektionsphase von 5 min injiziert. Es schloß sich eine Dissoziationsphase von 10 min, ein EDTA-Puls (T50, 350 mM EDTA, 1 M NaCl) zur Regeneration und eine Nulllinie von 10 min an. Die 10 minütige Nulllinie wurde bei diesem Experiment in verschiedene Phasen aufgegliedert, um alle Flußverbindungen des SPR-Spektrometers effektiv ausspülen zu können. Im Unterschied zu den anderen Experimenten erfolgte die zweite Injektion der einzelnen Konzentrationen nachdem alle Probenlösungen einmal gemessen waren und nicht im direkten Anschluss. Außerdem wurde die Reihenfolge der Proben variiert, indem zunächst die zwei geringsten Konzentrationen injiziert wurden, gefolgt von den drei proteinreichsten Lösungen und schließlich die restlichen in aufsteigender Proteinmenge. Durch eine solche Randomisierung der Proben werden Messfehler durch Veränderung des Chips über die Zeit ausgeschlossen. Die Temperatur der Messung lag erneut bei 20°C mit einer Schwankung von 0,061°C.

Insgesamt zeigt das Sensogramm der jeweils ersten Injektionen sehr schwache Bindungssignale von maximal 8 RU (Abb. 19). Hierzu tragen die, im Vergleich zu den anderen Messungen, niedrigeren Konzentrationen von 1,1-225,3 nM bei. Dennoch lässt sich an den höheren Konzentrationen der Verlauf einer typischen Bindungskurve ablesen mit einem raschen Anstieg des SPR-Signals auf ein Plateau, das bis zum Ende der Injektionsphase ($t= 300$ s) anhält. Anschließend fällt das Signal nahezu auf die Nulllinie zurück. Zusätzliche, spezifische Merkmale der Bindungskurve lassen sich nicht erkennen. Trägt man das SPR-Signal in Abhängigkeit von der Konzentration auf (s. Abb. 19 B), finden sich die niedrigen Konzentrationen in einem Bereich zwischen -1 und +2 RU von der Nulllinie. Die höheren Konzentrationen ergeben dagegen höhere SPR-Signale, sodass die Bindung konzentrationsabhängig ist. Insofern liefert das Experiment mit α -Nrxn folgende Erkenntnisse: 1) Auch für α -Nrxn ist eine spezifische Bindung nachweisbar. 2) Diese Bindung ist konzentrationsabhängig, d.h. das Signal ist proportional zu den eingesetzten Konzentrationen.

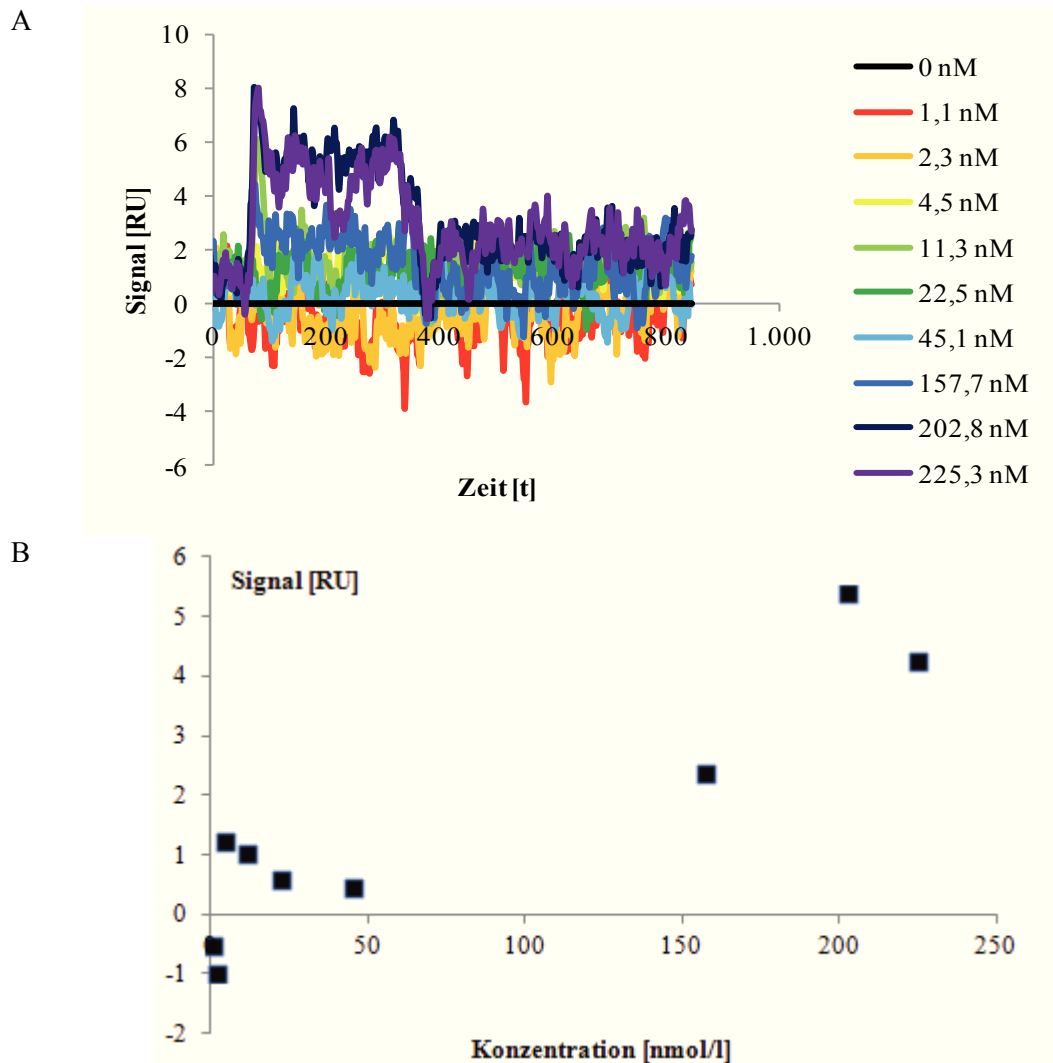


Abb. 19: SPR-Messung zwischen α -Nrxn und Nlgn Δ B. A: Das Sensogramm zeigt das SPR-Signal in Abhängigkeit von der Zeit. Nlgn Δ B wurde auf einem CMD-Chip immobilisiert und anschließend die Bindung an α -Nrxn in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Im Sensogramm sind die Nulllinie, die Injektionsphase von 5 min (Beginn bei ca. $t=80$ s) und fast die ganze Dissoziationsphase abgebildet. B: Darstellung des SPR-Signals in RU (Plateauphase) in Abhängigkeit von der Konzentration in nmol/l für die einzelnen Nrxn-Konzentrationen.

Für zukünftige α -Nrxn Experimente sind weitere Optimierungsschritte notwendig, um quantitative Daten zur Interaktion mit Nlgn Δ B zu erhalten. In erster Linie muss die Menge des eingesetzten α -Nrxn deutlich gesteigert werden, da die bisherige Proteinkonzentration zu gering ist (s. Abb. 19 A). Aufgrund der schlechten Ausbeute mit HEK293-Zellen, selbst beim Einsatz von über 100 10 cm Platten, erfordert dieser Schritt die Etablierung neuer und effektiverer Expressionssysteme. Alternativ kann α -Nrxn als Ligand auf dem Messchip immobilisiert werden, da sich vom Bindungspartner Nlgn leichter größere Mengen Protein herstellen lassen. Experimentell sollte in diesem Fall, in Anlehnung an Miller, ein PA-CMD-Chip verwendet

werden, der an das IgG des α -Nrxn-IgG Fusionskonstruktes bindet (Miller et al., 2011) und dadurch eine einheitliche Orientierung der α -Nrxn- Moleküle ermöglicht (de Crescenzo, 2008; Jason-Moller et al., 2006; Myszka, 1997). Dieses Vorgehen garantiert ein Maximum an erreichbaren Bindungsstellen und eine reliable, reproduzierbare Kinetik (de Crescenzo, 2008). Dagegen ist bei der Immobilisation auf dem CMD-Chip durch zufällige Kopplung an die ubiquitären Aminogruppen des Nrxn nicht jede Bindungsstelle erreichbar mit der Folge einer möglichen SPR-Signalveränderung (de Crescenzo, 2008; O'Shannessy, 1994).

Die vorgestellten Optimierungen würden den Rahmen dieser Dissertation deutlich überschreiten. Insofern möchte ich abschließend nur theoretisch auf die weiteren experimentellen Schritte eingehen.

Als Erstes sollte eine erfolgreiche Quantifizierung der Interaktion von α -Nrxn mit Nlgn Δ B angestrebt werden. Ausgehend hiervon kann ein direkter Vergleich zwischen α -Nrxn und β -Nrxn in einem gemeinsamen Experiment erfolgen, bei dem für beide Proteine K_d -Werte ermittelt werden. Nach erfolgreicher Durchführung einer quantitativen Messung mit α -Nrxn sind zahlreiche weitere SPR-Bindungsstudien denkbar, z.B. der Vergleich der unterschiedlichen Nlgn (1-4) in Interaktion mit α -Nrxn. Mit Sicherheit werden diese zukünftigen SPR-Experimente das Verständnis der Interaktion weiter vertiefen.

4 Diskussion

Die folgende Diskussion soll die im Ergebnisteil vorgestellten Daten vor dem Hintergrund der Literatur erörtern. Hierbei möchte ich sowohl auf die methodischen Zusammenhänge der SPR-Messung als auch auf die Interaktion zwischen Nr_{xn} und Nl_{gn} eingehen. Entsprechend gliedert sich die Diskussion in zwei thematische Abschnitte, von denen der erste die technischen Aspekte berücksichtigt und dabei Vor- und Nachteile der SPR als Messmethode herausarbeitet. Hieran schließen sich Überlegungen zur Konzeption des vorgestellten Protokolls an. Darauf folgt der zweite Abschnitt der Diskussion, in dem die konkreten Ergebnisse der Arbeit für die LNS6 und β -Nr_{xn} beurteilt und eingeordnet werden sollen. In diesem Zusammenhang stelle ich ein Bindungsmodell vor, das die inhibitorische Wirkung der β -spezifischen Sequenz erklären kann. Abschließend möchte ich in einem Ausblick weitere, zukünftige Anwendungsmöglichkeiten der SPR-Methode im Hinblick auf den Nr_{xn}/Nl_{gn}-Komplex aufzeigen.

4.1 Vorteile und Limitationen der SPR-Technologie

Die SPR-Methode ist eine optische Messmethode, die qualitative und quantitative Daten erfasst, mit deren Hilfe sich Affinität und Kinetik quantifizieren lassen (Jason-Moller et al., 2006; Malmqvist et al., 1997). Ein wesentlicher Vorteil dieser Messmethode ist die fehlende Notwendigkeit zur Markierung von Ligand und Analyt, sodass native Proteine miteinander verglichen werden (Homola, 2003; Jason-Moller et al., 2006; Malmqvist et al., 1997; O'Shannessy, 1994; Piliarik et al., 2009; Rich et al., 2000; Van Regenmortel, 2003; Willander et al., 2009). Dies hat wesentliche Auswirkungen auf die Messung von Protein-Protein-Interaktionen, da markierte Proteine eine schlechtere Bindung aufweisen können (Vashist, 2012). Ein zusätzlicher Vorteil besteht in der Messung in Echtzeit (de Crescenzo, 2008; Homola, 2003; Jason-Moller et al., 2006; Malmqvist et al., 1997; O'Shannessy, 1994; Rich et al., 2000; Van Regenmortel, 1994, 2003). In dieser Arbeit erfolgte die Erfassung des SPR-Signals in Abständen von 2 s mit der Folge einer sehr engmaschigen Kontrolle des Experimentverlaufs. Gleichzeitig ermöglichte der automatische Ablauf (Jason-Moller et al., 2006; Malmqvist et al., 1997) lange Experimentzeiten von über 12 h. Aufgrund dieser Aspekte wählte ich die SPR-Methode als experimentelle Grundlage dieser Arbeit.

Allerdings besitzt die Methodik auch Nachteile, die im Weiteren diskutiert werden. In den Testexperimenten zeigte sich eine Anfälligkeit gegenüber Störeinflüssen, z.B. durch unspezifische Bindungen zwischen dem Analyten mit der Chipoberfläche oder durch

Unterschiede in der Pufferzusammensetzung (s. 3.2 Spezifität des Bindungsassays; Homola, 2003; Willander et al., 2009). Zur Vermeidung dieser Einflüsse sollten Ligand und Analyt als homogene Lösung vorliegen (Jason-Moller et al., 2006), eine Forderung, die mithilfe des mehrschrittigen Aufreinigungsprozesses der Proteine erfüllt wird. Weiterhin wird das „Prinzip der doppelten Referenz“ angewandt: Vom SPR-Signal des Signalkanals wird das Signal des Referenzkanals und das von Leerproben, die nur Puffer enthalten, subtrahiert, sodass ein spezifisches SPR-Signal entsteht (de Crescenzo, 2008; Rich et al., 2000; Van Regenmortel, 2003). Die vorgestellten Antikörperexperimente zeigten, dass der gewählte Bindungsassay eine ausreichende Spezifität für die Bindung einer Protein-Protein-Interaktion hat und dadurch auch für den Nr₁xn/Nlgn-Komplex verwendet werden kann.

Die Temperatur während der Messung stellt eine weitere Einflussgröße dar, da sie das Wellenlängenspektrum der Lichtquelle beeinflusst (Piliarik et al., 2009). Für eine stabile Wellenlänge empfehlen Piliarik et al. eine Aufwärmzeit des SPR-Spektrometers von 20-60 min, die Fa. Reichert für das verwendete Spektrometer SR7000DC sogar von 1,5 h (Piliarik et al., 2009). Bei der Durchführung der Experimente wurde das SPR-Spektrometer stets 20 min vor Beginn der ersten Gerätereinigung (s. 2.10.2 Ablauf der SPR-Messung) eingeschaltet. Die Messung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte erst 5-6 h später, sodass die vorgeschlagenen Aufwärmzeiten in jedem Fall eingehalten wurden. Des Weiteren variiert das SPR-Signal um 80 RU pro °Celsius Temperaturschwankung (Jung, 1998). Entsprechend zeigten Protein-Interaktionsmessungen mit der SPR-Technologie, dass sich sowohl k_a , k_d , als auch K_d bei steigender Temperatur veränderten (Patel et al., 2010). Die vorgestellten Nr₁xn/Nlgn-Experimente wiesen eine Messtemperatur von 20°C auf mit Schwankungen von 0,054°C-0,061°C. Diese Temperatur ist für den experimentellen Ablauf gut geeignet, da sie einerseits bei RT leicht einstellbar ist und andererseits eine Denaturierung der Proteinproben während der Experimente verhindert. Nach obengenannter Umrechnung ergibt sich eine Schwankung des SPR-Signals von 4-5 RU durch Temperatureinflüsse, die damit keinen wesentlichen Störfaktor der Messung darstellten. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass die Temperatur von 20°C nur ein Modell für die physiologischen Prozesse im Gehirn darstellt, denn die cerebrale Temperatur liegt deutlich höher. Daten aus Rattenversuchen ermittelten eine Gehirntemperatur zwischen ca. 35,5 und 37°C mit situations- und verhaltensabhängigen Schwankungen von 2 bis 4° C (Kiyatkin, 2010, 2013). Bei der Durchführung eines Experiments unter diesen Bedingungen ist eine Denaturierung der Proteinproben im Spektrometer nicht auszuschließen.

Unter Berücksichtigung der Vor- und Nachteile der Methodik konnte im Folgenden ein Messprotokoll konzipiert werden. Das nächste Kapitel verdeutlicht einige der Kriterien, die für die Erstellung eines solchen Protokolls von Bedeutung waren.

4.2 Etablierung eines Messprotokolls

Nach der Wahl der SPR-Technologie als Messmethode dieser Arbeit mussten die einzelnen Parameter wie Lösungszusammensetzung und Protokollablauf ausgewählt werden. Zunächst wurde, orientiert an einigen der vorhergegangenen Experimente, der Laufpuffer zusammengestellt. In Anlehnung an Koehnke et al. 2008 und 2010 handelte es sich um einen Tris-Puffer, allerdings mit einer Konzentration von 50 mM, um mehr Pufferkapazität zu schaffen (s. Tabelle 2; Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010). Die meisten anderen Arbeiten setzten einen HEPES-Puffer ein (s. Tabelle 2; Araç et al., 2007; Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2004; Comoletti et al., 2006; Comoletti et al., 2010; Gjørland et al., 2012; Leone et al., 2010; Miller et al., 2011). Der pH-Wert des Puffers meiner Experimente lag zwischen 7,05 und 7,5 - in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die einen pH-Wert im neutralen Bereich (pH 7,4; s. Tabelle 2) wählten. Im Sinne der Vergleichbarkeit ist in Zukunft ein einheitlicher T50 Puffer mit pH 7,4 oder 7,5 anzustreben.

Zusätzlich zum Tris mussten weitere Bestandteile hinzugefügt werden. Aufgrund der Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen Nrnx und Nlgn, die sich in Proteinblots (Nguyen et al., 1997) und SPR-Experimenten (Comoletti et al., 2003) zeigte, waren Calciumionen ein obligater Bestandteil des Laufpuffers. Zwar erfolgte auch eine Bindung in Experimenten, bei denen Calcium nur im Puffer der Probe und nicht im Laufpuffer enthalten war, das SPR-Signal war aber niedriger (Comoletti et al., 2003). Außerdem wird so die gewünschte Homogenität zwischen Lauf- und Probenpuffer (s.o.) nicht erreicht. Den abschließenden Teil des Laufpuffers bildete NaCl, dessen Konzentration von 80 mM einen Kompromiss zwischen unterschiedlichen Erfordernissen des Bindungsassays darstellt. Mithilfe einer Konzentration von 150 mM NaCl lassen sich Matrixeffekte auf dem Chip verhindern (Karlsson et al., 1997). Matrixeffekte entstehen zum einen durch die gegenseitige Abstoßung der Dextransketten auf dem Chip, zum anderen durch die immobilisierten Proteine, die untereinander und mit den CMD anziehend oder abstoßend wirken können (Karlsson et al., 1997). Insgesamt führen diese Interaktionen zu einer Vergrößerung der Chipmatrix, sodass innerhalb des elektromagnetischen Felds der OP eine veränderte Massenverteilung vorliegt (Karlsson et al., 1997). Entsprechend ändert sich das SPR-Signal (Karlsson et al., 1997). Allerdings behindert eine zu hohe NaCl-Konzentration die elektrostatische Interaktion zwischen Nrnx und Nlgn und erzeugt ein niedrigeres SPR-Signal (Comoletti et al., 2003). Durch die Verwendung von 75 mM NaCl nahm das SPR-Signal bei einer Messung mit Nlgn1 und β -Nrnx um 30% ab und NaCl-Konzentrationen von 600 mM

NaCl verhinderten die Bindung ganz (Comoletti et al., 2003). In anderen Arbeiten reduzierte eine NaCl-Konzentration von 150 mM das SPR-Signal der Interaktion zwischen Nlgn1 und der LNS6 nur unwesentlich, aber verminderte die Bindung der LNS6 an Nlgn4 um 50% (Leone et al., 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse enthielt der Laufpuffer bei den Experimenten mit LNS6/ β -Nrxn kein NaCl, obwohl der obengenannte Vorteil einer Maskierung von Matrixeffekten, die Beimischung von zumindest 75-80 mM NaCl sinnvoll erscheinen lässt. In den Vergleichsexperimenten der Literatur betrug die Konzentration von NaCl im Laufpuffer häufig 150 mM (s. Tabelle 2; Araç et al., 2007; Comoletti et al., 2006; Comoletti et al., 2010; Gjørnlund et al., 2012; Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010). Trotz der in diesen Experimenten erreichten hohen SPR-Signale (Araç et al., 2007; Comoletti et al., 2006; Comoletti et al., 2010; Gjørnlund et al., 2012; Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010) ist ein solches Vorgehen a priori, d.h. ohne Kenntnis der zu Grunde liegenden Bindung, riskant. Entsprechend sollte die Beimischung von NaCl nur dann erfolgen, wenn ein ausreichend hohes Signal zu erwarten ist, weshalb sie bei zukünftigen Experimenten mit α -Nrxn zu vermeiden ist.

Neben dem Laufpuffer wurde für die Experimente eine Regenerationslösung benötigt, die die nicht-kovalenten Bindungen zwischen Ligand und Analyt auftrennen sollte (Jason-Moller et al., 2006). Auch hier wurde als Puffergrundlage 50 mM Tris gewählt und, aufgrund der Calciumabhängigkeit des Komplexes, der Chelator EDTA in einer ausreichend hohen Konzentration von 350 mM hinzugefügt. Dies erfolgte analog zu einigen Referenzarbeiten (s. Tabelle 2, Koehnke et al., 2010; Miller et al., 2011). In späteren Experimenten enthielt die Regenerationslösung weiterhin 1 M NaCl, eine Konzentration, die die Bindung zwischen Nrxn und Nlgn in SPR-Experimenten auflösen sollte (Comoletti et al., 2003, s.o.), um eine noch gründlichere Regeneration zu erzielen. Auch andere Arbeiten verwendeten 1 M NaCl als Bestandteil der Regenerationslösung, nutzen dafür jedoch deutlich weniger (3-5 mM) oder kein EDTA bzw. EGTA (s. Tabelle 2; Araç et al., 2007; Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006; Comoletti et al., 2010; Gjørnlund et al., 2012; Leone et al., 2010). Folglich war in meinen Experimenten nach der Regenerationsphase ein gründliches Durchspülen aller Flussverbindungen mit Laufpuffer besonders wichtig, ansonsten drohte die Kontamination des nächsten SPR-Messzyklus. Einige Arbeiten verzichteten ganz auf eine spezifische Regenerationslösung und ließen den Komplex in der Dissoziationsphase langsam zerfallen (Koehnke et al., 2008). Dieses Vorgehen erscheint angesichts der teilweise sehr langsamen Dissoziationen nicht sinnvoll.

Zuletzt musste die Frage geklärt werden, welcher der beiden Bindungspartner auf dem Chip immobilisiert werden sollte. Zunächst führte ich Experimente mit immobilisiertem Nrxn durch,

die jedoch nur ein geringes Signal aufwiesen, da Nlgn nicht in ausreichend hoher Konzentration aufgereinigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Außerdem bestand in dieser Anordnung die Gefahr von Aviditätseffekten, die bei der Verwendung eines bivalenten Analyten (z.B. Nlgn) auftreten (Jason-Moller et al., 2006; Myszka, 1997). In dieser Situation ist eine Bindung des Analyten an zwei Liganden gleichzeitig möglich, sodass nach Auflösung einer Interaktion der Analyt noch am Chip verbleibt (Jason-Moller et al., 2006). Dadurch kommt es zu einer Verzögerung der Dissoziation und die Affinität der Bindung wird überschätzt (Jason-Moller et al., 2006). Obwohl Nlgn als monomeres Konstrukt exprimiert wird, lagert es sich in Lösung zu einem Dimer zusammen (Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006) und ist somit ein bivalenter Analyt mit der Gefahr von Aviditätseffekten. Dieser Sachverhalt wird in einer Arbeit als expliziter Grund für die Immobilisation von Nlgn angegeben (Koehnke et al., 2008). Jedoch wies eine groß angelegte Vergleichsarbeit zur SPR-Messung einer Antigen-AK Interaktion nach, dass es keinen Unterschied machte, welcher der beiden Bindungspartner immobilisiert wurde (Rich et al., 2009). Im Bezug auf die Nrnx/Nlgn-Interaktion konnte eine Referenzarbeit keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Messung mit immobilisiertem Nlgn oder Nrnx feststellen (Comoletti et al., 2003). Abweichend davon zeigte die gleiche Arbeitsgruppe in einer weiteren Arbeit, dass bei immobilisiertem Nlgn die SPR-Signale der Duplikatinjektionen stark divergieren können mit unspezifischen Signalveränderungen (Comoletti et al., 2006). Diese Veränderungen beeinträchtigten die hier durchgeführten Messungen nicht, sodass aus Gründen der Avidität Nlgn immobilisiert wurde. In der Literatur (s. Tabelle 2) finden sich sowohl Beispiele für eine Immobilisation von Nrnx (Boucard et al., 2005; Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2004; Comoletti et al., 2006; Comoletti et al., 2010; Gjørland et al., 2012; Leone et al., 2010) als auch von Nlgn (Araç et al., 2007; Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010; Miller et al., 2011). Die Menge des dabei immobilisierten Proteins variiert zwischen 500 RU (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010) und 10.000 RU (Boucard et al., 2005). Hierbei ist zu beachten, dass zur Vermeidung von Massentransporteffekten niedrige Immobilisationsmengen verwendet werden sollten (de Crescenzo, 2008; Jason-Moller et al., 2006; Myszka, 1997; Rich et al., 2000; Van Regenmortel, 2003). Der Begriff „Massentransporteffekt“ beschreibt eine Situation, in der nicht primär die Affinität zum Liganden die Assoziation und Dissoziation des Analyten bestimmt, sondern die Diffusionsgeschwindigkeit vom und zum Messchip (de Crescenzo, 2008; Jason-Moller et al., 2006; Myszka, 1997; Rich et al., 2000; Van Regenmortel, 2003). Empfehlungen zur Vermeidung von Massentransporteffekten umfassen eine Immobilisation im Bereich von 50 -150 RU, das Hinzufügen von 100-200 mM Salz zum Laufpuffer und die Verwendung einer Flussrate von über 30µl/min (Jason-Moller et al., 2006; Myszka, 1997; Van Regenmortel, 2003). Mit einer

Flussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ in der Injektionsphase und dem Hinzufügen von 80 mM NaCl im Laufpuffer wurden diese Vorschläge teilweise berücksichtigt. Die Existenz von Massentransporteffekten lässt sich bei den Nr_{rxn}/Nlgn-Experimenten hier nicht gänzlich ausschließen, da ein 1:1 Bindungsmodell die Interaktion nicht vollständig beschreibt. Allerdings liefert auch die Interpolation einer ausschließlich durch Massentransport gesteuerten Interaktion in der Auswertung keine Übereinstimmung mit einer 1:1 Interaktion. Eine gleichzeitige Beeinflussung der Kinetik durch Avidität und Massentransport ist denkbar (van Regenmortel, 2003) und möglicherweise auch bei den hier gezeigten Experimente vorhanden. Allerdings resultiert eine niedrige Immobilisation in einem schlechten Verhältnis von Messsignal zu Störeinflüssen (Rich et al., 2000). Entsprechend habe ich mich bei diesen Experimenten für eine Immobilisation von ca. 1.400 und 1.900 RU entschieden, um ein deutliches Signal zu erhalten. Nachdem die Einflussgrößen und Messparameter der SPR-Messungen eingehend vorgestellt wurden, soll nun die Diskussion der Messungen erfolgen. Wie auch in den Resultaten möchte ich hierbei mit der Interaktion zwischen der LNS6 und Nlgn Δ B beginnen.

Auf der nächsten Seite: Tabelle 2: Übersicht über bisherige Arbeiten mit SPR zum Nr_{rxn}/Nlgn-Komplex

Die Tabelle bietet einen Vergleich verschiedener Arbeiten, die zum Nr_{rxn}/Nlgn-Komplex mit SPR durchgeführt wurden und zeigt experimentelle Parameter, auf die in der Diskussion Bezug genommen wird.

Nlgn1A, 2A: Nlgn mit Spleißeinfügung A

Nlgn1 Δ A, Nlgn1 Δ B, Nlgn1 Δ AB: Nlgn ohne Spleißeinfügung A bzw. B bzw. AB

Tabelle 2: Übersicht über bisherige Arbeiten mit SPR zum Nr_{rxn}/Nlgn-Komplex

Arbeit	Araç, 2007	Boucard, 2005	Comoletti, 2003	Comoletti, 2004	Comoletti, 2006	Comoletti, 2006 zusätzliche Experimente	Comoletti, 2010
Gerät	BIACore 3000	BIACore 3000	BIACore 3000	BIACore 3000	BIACore 3000		BIACore 3000
Chip	CMD (CM 3)	CMD (CM 5 BIACore)	CMD (CM 5 BIACore)	CMD (CM 5 BIACore)	CMD (CM 5 BIACore)		CMD (CM 5, GE Healthcare)
Laufpuffer	10 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, 0,005%(v/v) Surfactant P20, 1% BSA	10 mM HEPES (pH 7,4), 2 mM CaCl ₂ , 0,005% (v/v) Surfactant	HEPES (pH 7,4), 2 mM CaCl ₂ , 0,005% (v/v) Surfactant	10 mM HEPES (pH 7,4), 2 mM CaCl ₂ , 0,005% (v/v) Surfactant	10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,005% (v/v) Surfactant		10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,005% (v/v) Surfactant P20
immobilisiertes Molekül	Nlgn1 (mutierte Nlgn1-Konstrukte)	Protein A (Sigma) indirekt Ig-Nr _{rxn}	Protein A (Sigma) indirekt β-Nr _{rxn}	β-Nr _{rxn} ohne Spleißeinfügung 4	β-Nr _{rxn} mit/ohne Spleißeinfügung 4	Vergleich zu β-Nr _{rxn} ohne Spleißeinfügung 4	Nr _{rxn} 1α
immobilisierte Menge (ca.)	600-700 RU	10.000 RU	100-1.000 RU	3.000 RU	1.000-3.500 RU	460 RU-570 RU	
injiziertes Protein	β-Nr _{rxn} ohne Spleißeinfügung 4	Nlgn1, Nlgn1ΔA, Nlgn1ΔB, Nlgn1ΔAB	trunkierte Nlgn-Konstrukte und Mutationen	Nlgn1 und Nlgn3 sowie Mutationskonstrukte	Nlgn1-4, unterschiedliche Spleißeinfügungen	jeweiliger Bindungspartner	Nlgn1ΔAB
Konzentrationsbereich für Injektionen	0,18 nM-30.000 nM (3-fach Verdünnung, Duplikate)	12-3.000 nM (3-fach Verdünnung)	bis zu 5.000 nM (2-fach Verdünnung)	3-fach Verdünnung; 6 Konzentrationen	maximal 40.000 nM (3-fach Verdünnung)	8,2-6.000 nM (Nlgn1ΔAB), 24,7 nM und 2000 nM (Nlgn4), 2,7-6.000 nM (β-Nr _{rxn} ohne Spleißeinfügung 4)	12-3.000 nM (3-fach Verdünnung)
Injektion	50 µl/min	150 s	20 µl/min für 150 s	50 µl/min für 160 s	50 µl/min für 160-180 s		50 µl/min für 120 s
Dissoziation und Regeneration			300 s Dissoziation, 30 s Regenerationslösung mit 50 µl/min	160 s Dissoziation	200-300 s Dissoziation, 30 s Regenerationslösung		150 s Dissoziation, 30 s Regenerationslösung
Referenzkanal	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Leerproben			ja			ja	
Regenerationslösung	10 mM HEPES (pH 7,4), 1 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% P20, 1% BSA		10 mM HEPES (pH 7,4), 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 0,005% Surfactant P20		1 M NaCl, 5 mM EGTA		1 M NaCl, 5 mM EGTA
Temperatur	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C		25°C

Fortsetzung Tabelle 2

Arbeit	Gjørlund, 2012	Koehnke, 2008	Koehnke, 2010	Leone, 2010	Leone, 2010 zusätzliche Experimente	Miller, 2011
Gerät	BiACore 2000	BiACore T100	BiACore T100	BiACore 3000		ProteON X 36
Chip	CMD (CM 4)	S NTA (GE Healthcare)	S NTA (GE Healthcare)	CMD (CM 5)		GLC Chip (Bio-Rad)
	10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,005%(v/v) Surfactant P20, mit 3 mM Ca ²⁺ oder PBS	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 3 mM CaCl ₂ , 0,005% (v/v) P20, 0,5 mg/ml bzw. 1 mg/ml BSA (LNS6 ohne bzw. mit Spleißeffügung 4)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 3 mM CaCl ₂ , 0,005% Tween 20, 1 mg/ml BSA	10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM Ca ²⁺		HBS, 3 mM Ca ²⁺ , 0,05% Tween 20, 1 mg/ml BSA
Laufpuffer						
immobilisiertes Molekül	Nrxn1	Nlgn1A, 2A	Nlgn1 - 3, alle Spleißkombinationen	Nlgn1,2,4	LNS6 ohne Spleißeffügung 4	Protein A indirekt Nlgn1ΔAAB
immobilisierte Menge (ca.)	3.600 RU	500-700 RU	500 RU	60-120 fmol	25-50 fmol	
injiziertes Protein	Nlgn1 und artifizielles Konstrukt	LNS6 mit/ohne Spleißeffügung 4	Nrxn1-3 (LNS6 mit/ohne Spleißeffügung 4)	LNS6 ohne Spleißeffügung, Mutationskonstrukte	Nlgn1, 2 und Mutationskonstrukte	LNS6 ohne Spleißeffügung 4, trunkierte α-Nrx Konstrukte
Konzentrationsbereich für Injektionen	50 nM - 800 nM	bis zu 4.000 nM (2-fach Verdünnung)	39-8.000 nM, (2-fach Verdünnung)	2,5-1.000 nM	111 nM	15,6-3.000 nM
Injektion	30 µl/min	50 µl/min für 60 s	50 µl/min für 60 s	20 µl/min für 180 s	50 µl/min für 300 s	50 µl/min für 60 s
		60 s Dissoziation mit 50 µl/min, 10 s Regenerationslösung mit 100 µl/min, 60 s Injektion von Puffer bei 50 µl/min	60 s Dissoziation mit 50 µl/min, 10 s Regenerationslösung mit 100 µl/min, 60 s Puffer mit 50 µl/min			600 s Dissoziationsphase, 18 s Regenerationslösung mit 100 µl/min, 60 s Laufpuffer mit 100 µl/min
Dissoziation und Regeneration		ja	ja	ja	ja	ja
Referenzkanal benutzt?	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Leertuben	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Regenerationslösung	15 µl 1 M NaCl	-	350 mM EDTA	5 mM EDTA	1 M NaCl, 5 mM EGTA, 0,005% P20	350 mM EDTA
Temperatur	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C

4.3 Die LNS6 in Interaktion mit Nlgn Δ B – neue Erkenntnisse über eine bekannte Bindung

Die Interaktion der LNS6 mit immobilisierten Nlgn Δ B überprüfte zum einen die Reliabilität des Bindungsassays, zum anderen sollte sie neue Erkenntnisse über die Bindung erbringen. Bereits in vorhergehenden Arbeiten wurde diese Versuchsanordnung gewählt (Araç et al., 2007; Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006; Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010; Miller et al., 2011), jedoch mit unterschiedlichen Ergebnissen. Dementsprechend schien es sinnvoll diese Bindung mit einem eigenen Versuchsprotokoll nochmal eingehend zu untersuchen.

Für die Injektions- und die Dissoziationsphase wählte ich ausgedehnte Zeitintervalle, um die Interaktion über einen längeren Zeitraum zu betrachten. Die Dauer der Injektionsphase betrug 5 min und sollte damit für die LNS6 und für β -Nrxn ausreichend lang zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes sein. Im Vergleich dazu wiesen die Referenzarbeiten Injektionsphasen mit einer Dauer zwischen 1 min (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010) und 5 min (Leone et al., 2010) auf (s. Tabelle 2). Allerdings zeigten einige Experimente, dass die β -Nrxn/Nlgn Interaktion innerhalb einer Injektionsphase von 2,5 min kein Signal-Plateau erreichte (Boucard et al., 2005; Comoletti et al., 2003). Entsprechend wurde in meinen Experimenten eine Injektionsphase von über 3 min verwendet. Dieses Vorgehen wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit gerechtfertigt, da β -Nrxn erst 200 bis 300 s nach Beginn der Assoziation ein SPR-Signalplateau aufweist. Im Unterschied hierzu erreicht die LNS6 ohne Spleißbefügung 4 innerhalb weniger Sekunden einen Gleichgewichtszustand und benötigt daher keine lange Assoziationsphase. Dieser Verlauf des SPR-Signals der LNS6 korrespondiert mit Signalkurven aus der Literatur (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das SPR-Signal der LNS6 gegen Ende der Injektionsphase leicht abnimmt, insbesondere im Vergleichsexperiment mit β -Nrxn. Möglicherweise lösen sich gebundene Analyt- bzw. Ligandenmoleküle (wieder) von der Chipoberfläche und verändern so die Messwerte (Van Regenmortel, 2003). Dem zu Grunde kann eine inhomogene Probenzusammensetzung liegen mit einer geringeren Konzentration am Ende der Injektionsphase, die eine Dissoziation fördert. Insofern ist der Gleichgewichtszustand („*Steady-State*“) keineswegs so stabil wie es der Name suggeriert. Vielmehr kann das Gleichgewicht zwischen Komplexbildung und -zerfall auch wieder zur Dissoziation tendieren und das SPR-Signal demzufolge abnehmen. Insgesamt wird das SPR-Signal hierdurch jedoch nur gering beeinflusst und fällt z.B. bei der höchsten Konzentration der LNS6 um ca. 8% ab.

Als Länge der Dissoziationsphase wählte ich 10 min, aufgrund der bekannten nanomolaren Affinität der Bindung. Dieser Abschnitt des SPR-Messzyklus dauerte in den Referenzarbeiten

(s. Tabelle 2) zwischen 1 min (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010) und 10 min (Miller et al., 2011). Mit einer Dauer von 15 min für Injektions- und Dissoziationsphase stellt das angewandte Protokoll die bisher längste Beobachtungszeit der Nr_{xn}/Nlgn Interaktion in SPR vor. In der Dissoziationsphase der hier gezeigten Experimente (s. Abb. 17, 18) löst sich die LNS6 langsam ab und benötigt länger um die Nulllinie zu erreichen, sofern dies überhaupt geschah. Ein Grund hierfür ist die Menge an immobilisiertem Protein (ca. 1.400 und 1.900 RU), das eine dichte Matrix auf dem Messchip bildet und eine erneute Bindung begünstigt (s. Abb. 5). Das Wiederbinden an die Chipmatrix stellt eine Form des Massentransports dar (Van Regenmortel, 2003), durch das die tatsächliche Dissoziationsrate unterschätzt werden kann (de Crescenzo, 2008). Jedoch lässt sich die Bindung unter Berücksichtigung dieser Effekte nicht besser auswerten (s.o.). Im Vergleich zu dem hier dargestellten Verlauf erreichte das SPR-Signal in Referenzarbeiten nach Ende der Injektion innerhalb weniger s wieder die Nulllinie (Koehnke et al., 2010; Miller et al., 2011), sodass sich die Frage nach möglichen Massentransporteffekten nicht stellte.

Insgesamt zeigt das geschilderte Experiment mit Nlgn Δ B und der LNS6 eine hohe Übereinstimmung zu vergleichbaren Versuchen. So konnte mithilfe des verwendeten Protokolls die Auswirkung der β -spezifische Sequenz auf die Bindung zwischen Nr_{xn} und Nlgn bestimmt werden, die im folgenden Kapitel thematisiert wird.

4.4 Die β -spezifische Sequenz

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal zwischen der LNS6 und der vollständigen extrazellulären Sequenz des β -Nr_{xn} in SPR-Messungen differenziert und ihr unterschiedliches Bindungsverhalten charakterisiert. Kritisch lässt sich einwenden, dass der hier vorgestellte Vergleich artifiziell ist, da die LNS6 als Protein in vivo nicht vorkommt. Obwohl dieser Einwand sicherlich berechtigt ist, wird dadurch das hier gezeigte Ergebnis nicht eingeschränkt. Stattdessen macht es deutlich, dass die β -spezifische Sequenz eine Auswirkung auf die Bindung zu Nlgn hat und bei der Simulation von Bindungen auf jeden Fall im Nr_{xn}-Konstrukt vorhanden sein muss.

Die SPR-Messung zeigt, dass die β -spezifische Sequenz die Bindung an Nlgn um ca. das 6,4 fache erschwert (72,4 nM vs. 460 nM). Dies ist vergleichbar mit den Auswirkungen der Spleißeinfügung 4, die die Bindung an Nr_{xn}1 um das 2-7 fache abschwächt (Koehnke et al., 2010). Außerdem weist die Bindungskurve des β -Nr_{xn} einen charakteristischen Verlauf mit einer langsamen Assoziation und Dissoziation des Komplexes auf (Details unter 3.4 Die β -spezifische Sequenz behindert die Bindung an Nlgn). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die β -spezifische Sequenz die Komplexbildung hemmt.

Die Struktur des β -Nrnxn/der LNS6 liefert Anhaltspunkte für die inhibitorische Wirkung: In einer ersten strukturellen Untersuchung des β -Nrnxn ließ sich die β -spezifische Sequenz nicht kristallisieren (Rudenko et al., 1999), möglicherweise ein Zeichen für die Ausbildung unterschiedlicher Konformationen des N-Terminus. Nach dieser Vorstellung könnte sich die Folge aus 37 AS dynamisch und flexibel anordnen. In Abb. 20 sind zwei potenzielle Tertiärstrukturen abgebildet, die die β -spezifische Sequenz in einer elongierten (A) und einer kompakten (B) Konformation zeigen. Es ist denkbar, dass die kompakte Struktur (B) die Bindung an Nlgn beeinflusst, da der N-Terminus in direkter Nachbarschaft der Calciumbindungsstelle und damit der Bindungsstelle von Nlgn (grün in Abb. 20) zu liegen kommt.

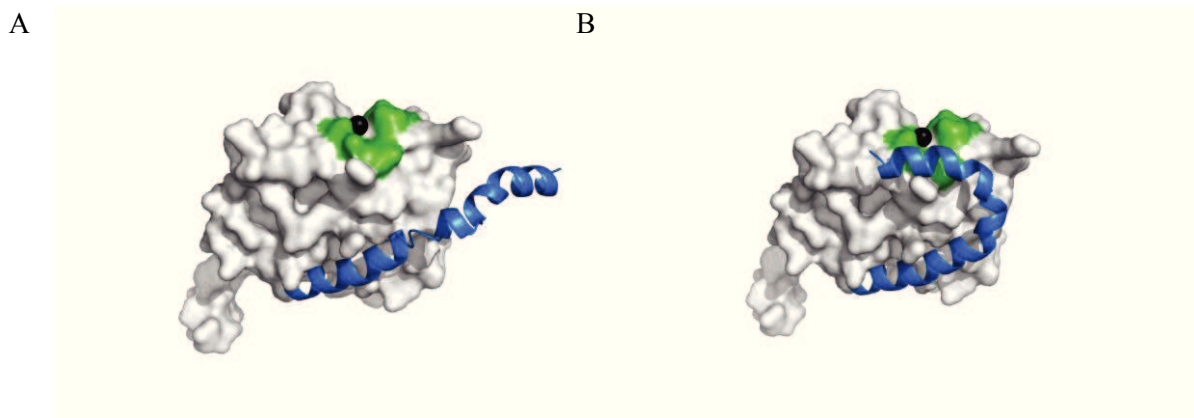


Abb. 20: Alternative Konformationen der β -spezifischen Sequenz. Dargestellt sind zwei strukturelle Modelle für den extrazellulären Anteil des β -Nrnxn mit unterschiedlicher Konformation der β -spezifischen Sequenz (blau) mit A: elongierter und B: kompakter Ausformung. grau: LNS; grün: Bindungsbereich mit Nlgn; schwarz: Ca^{2+} -Ion. Die Abbildung wurde von Dr. Carsten Reissner erstellt.

Für eine Bindung muss sich die β -spezifische Sequenz erst umformen oder wegbewegen, sodass die Komplexbildung mit Nlgn deutlich behindert wird. Es ist zu berücksichtigen, dass die Kristalle über eine längere Zeit inkubierten, während der in der SPR gebildete Komplex nur für einige s bis min besteht. Insofern ist es fraglich, ob die beiden Nrnxn/Nlgn-Komplexe strukturell identisch sind, denn möglicherweise entstehen bei dem nur kurzen Aufeinandertreffen der beiden Proteine in der SPR deutlich flexiblere Strukturen.

Die Dissoziationsphase zeigt für β -Nrnxn einen initial langsameren Zerfall des Komplexes im Vergleich zur LNS6, sodass für β -Nrnxn eine stabilisierende Wirkung anzunehmen ist. Eine Erklärung hierfür liefert ein Modell des β -Nrnxn, in dem die β -spezifische Sequenz eine

abstehende Helix bildet, die wahrscheinlich eine Stabilisierung der LNS bewirkt (Reissner et al., 2008; s. Abb. 21). Insofern erschwert die spezifische Sequenz des β -Nrnx initial eine Bindung an Nlgn, stabilisiert den Komplex jedoch nach erfolgter Assoziation. Zukünftige Experimente sollten der Fragestellung nachgehen, ob diese Wirkung durch die vorliegende AS-Sequenz erzeugt wird oder Folge sterischer Wechselwirkungen ist. Um diese Frage zu beantworten, sollte β -Nrnx mit einer LNS6 verglichen werden, die am N-Terminus eine zusätzliche und zufällige Abfolge von 37 AS trägt.

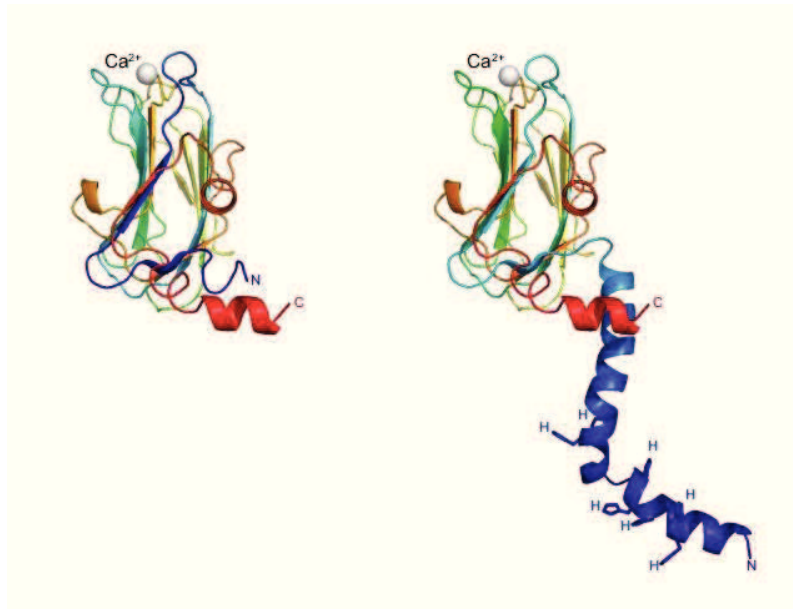


Abb. 21: Tertiärstruktur der LNS6 und des β -Nrnx im Vergleich. Der extrazelluläre Anteil der LNS6 (rechts) und des β -Nrnx (links) beinhaltet eine LNS, deren einzelne Strukturmodule graduell von dunkelblau (N-Terminus) bis rot (C-Terminus) eingefärbt sind. Weiterhin ist in beiden Abbildungen am oberen Rand ein Ca^{2+} -Ion dargestellt (weiße Kugel), das für die Bindung an Nlgn notwendig ist. Das β -Nrnx enthält zusätzlich N-terminal eine spezifische Sequenz (dunkelblau), die als abstehende Helix Einfluss auf die Bindung an Nlgn nehmen kann. Die Abbildung wurde von Dr. Carsten Reissner erstellt.

Dieses These ergänzt außerdem ein Modell über die Rolle der Nrnx an sich entwickelnden GABAergen Synapsen, das für β -Nrnx eine langsamere Dynamik postuliert (Fu et al., 2010): Nach der Exozytose bindet β -Nrnx hochaffin an postsynaptische Bindungspartner wie Nlgn und verbleibt an der Synapse, im Unterschied zu α -Nrnx, das sich auch entlang der Präsynapse, des axonalen Schaftes und der Filopodien verteilen kann (Fu et al., 2010). Die β -spezifische Sequenz stabilisiert, wie in dieser Arbeit gezeigt, nach erfolgter Bindung an Nlgn den Komplex und verhindert so die diffuse Ausbreitung des β -Nrnx. α -Nrnx bindet nur mit geringer Affinität

an die postsynaptischen Bindungspartner und weist daher eine diffuse Verteilung auf (Fu et al., 2010). Zu diesem Modell passt die deutlich niedrigere Bindungsaffinität des α -Nrxn im Vergleich zum β -Nrxn in SPR-Experimenten (Boucard et al., 2005). In das dynamische Modell lassen sich weiterhin Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten einordnen, nach denen die Interaktion zwischen α -Nrxn und Nlgn Δ B die initiale präsynaptische Differenzierung vermittelt (Lee et al., 2010). Unter Berücksichtigung der bisherigen Arbeiten (Fu et al., 2010) entsteht dieser Effekt wahrscheinlich dadurch, dass sich α -Nrxn rasch entlang der Zellmembran bewegen kann und so früher eine Bindung etabliert.

Unklar ist, ob die β -spezifische Sequenz darüber hinaus noch weitere, spezifische Aufgaben erfüllt. Nach einem ersten Bindungsmodell sollte die Interaktion zwischen Nrxn und Nlgn nur beim Vorhandensein der β -spezifischen Sequenz zu Stande kommen (Ichtchenko et al., 1995), ein Verdacht, der sich in pulldown-Experimenten (Reissner et al., 2008) und SPR-Messungen (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010; Miller et al., 2011) sowie den SPR-Assays dieser Arbeit nicht bestätigte. Die Betrachtung der β -spezifischen Sequenz zeigt, dass insgesamt acht Histidine enthalten sind, die vielleicht Teil eines Bindungsmotivs sind (s. Abb. 22).

Ala-Ser-Ser-Leu-Gly-Ala-His-His-Ile-His-His-Phe-His-Gly-Ser-Ser-Lys-**His-His**-Ser-Val-Pro-Ile-Ala-Ile-Tyr-Arg-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Arg-Gly-Gly-**His**-Ala

Abb. 22: Die β -spezifische Sequenz des Nrxn1 β der Ratte. Die insgesamt acht Histidine sind fett hervorgehoben und das Bindungsmotiv für das Protein SdrC von *Staphylococcus aureus* ist unterstrichen dargestellt.

Über die AS-Sequenz His-His-Ile-His-His-Phe-His (s. Abb. 22) kann β -Nrxn an das Zellwandprotein SdrC von *Staphylococcus aureus*, einem gram-positivem Bakterium, binden (Barbu et al., 2010). Hierdurch avanciert β -Nrxn zu einem möglichen Zielprotein bei neuronalen und nicht-neuronalen Infektionen mit diesem Erreger (Barbu et al., 2010).

Außerdem vermag β -Nrxn mittels seines N- Terminus eventuell extrazellulär an ein divalentes Kation wie Zink zu binden. Ungebundenes Zink liegt im Nervensystem in den axonalen Terminalen einiger glutamaterger Synapsen vor, die sich besonders auf den Neokortex, den pyriformen Kortex, den perirhinalen Kortex, den Hippocampus, das Striatum und die Amygdala konzentrieren (Frederickson et al., 2000; Paoletti et al., 2009). Analog zu dem Transmitter Glutamat erfolgt die Speicherung des Übergangsmetalls in Vesikeln, die in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität und der Calciumkonzentration in den synaptischen Spalt entleert werden (s. 1.1. Die chemische Synapse; Frederickson et al., 2000; Paoletti et al., 2009). Einige experimentelle Befunde legen eine Funktion als Co-Transmitter nahe, da das freigesetzte Zink

an der Postsynapse unter anderem an NMDA-Rezeptoren binden kann und diese inhibiert (Paoletti et al., 2009; Sensi et al., 2011). Darüber hinaus wird eine Beteiligung an der Pathophysiologie von Epilepsie und Alzheimer-Demenz diskutiert (Frederickson et al., 2000; Paoletti et al., 2009; Sensi et al., 2011). Es ist denkbar, dass Zink nach seiner Freisetzung von den Histidinen der spezifischen Sequenz an der Präsynapse festgehalten wird. Histidin-Cluster stellen ein potentielles Bindungsmotiv für Zink, Eisen, Kupfer und Mangan dar (Cun et al., 2013). Unter Umständen interagiert β -Nrxn über die Komplexierung von Zink-Ionen mit anderen Proteinen oder dimerisiert extrazellulär mit einem weiteren β -Nrxn. Ein Beispiel für die zuletzt genannte Option ist das Insulin-Hexamere, dessen Monomere über das Histidin 10 ihrer B-Kette insgesamt zwei Zink-Ionen komplexieren (Brange et al., 1993). In zukünftigen Experimenten sollte diese Hypothese adressiert und damit die Frage beantwortet werden, ob über die spezifische Sequenz eine Bindung an weitere Partner oder eine Dimerisierung erfolgt. Dagegen besitzt α -Nrxn keine Histidin-reiche Sequenz (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov et al., 1993), sodass zusätzlich zur Ca^{2+} -Koordination (s.o.) keine Interaktion mit weiteren Metall-Ionen zu erwarten ist.

Im Unterschied zu dieser Arbeit bezeichnen die Referenzarbeiten unterschiedliche Konstrukte pauschal als „ β -Nrxn“ und subsummieren darunter sowohl die LNS6 (Koehnke et al., 2008; Koehnke et al., 2010; Leone et al., 2010; Miller et al., 2011) als auch β -Nrxn (Araç et al., 2007; Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006). Aufgrund dieser Tatsache verwundert es nicht, dass das berichtete Spektrum der K_d -Werte breit gestreut ist (s. Abb. 23) und von 16 nM (Leone et al., 2010) bis 845 nM (Koehnke et al., 2010) reicht. Unter Beachtung des verwendeten Proteins ergeben sich K_d -Werte von 16 nM (Leone et al., 2010), ca. 30 nM (Miller et al., 2011), 207 nM (Koehnke et al., 2008) und 845 nM (Koehnke et al., 2010) für die LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 (grün in Abb. 23) und K_d -Werte von 20,9 nM (Araç et al., 2007) und 29 nM (Comoletti et al., 2006) für β -Nrxn ohne Spleißeinfügung 4 (blau in Abb. 23). Die mittleren K_d -Werte betragen für die LNS6 274,5 nM und für β -Nrxn ca. 25 nM, sodass letzteres der bessere Bindungspartner des Nlgn Δ B zu sein scheint. Diese Annahme ist jedoch aus zwei Gründen ein Trugschluss: Einerseits werden in den angegebenen Arbeiten stets leicht andere Proteine verwendet; die Konstrukte für die LNS6, β -Nrxn und Nlgn unterscheiden sich um bis zu 50 AS. Es existieren bisher keine zwei Arbeiten, in denen exakt die gleichen Nrxn- und Nlgn-Konstrukte gemessen wurden. Andererseits sind die experimentellen Bedingungen der einzelnen Versuche verschieden (SPR-Spektrometer, verwendeter Messchip, Laufpuffer, Menge des immobilisierten Proteins etc.; s. Tabelle 2). Tatsächlich haben isolierte, absolute Messwerte nur eine eingeschränkte Aussagekraft gegenüber Messwerten, die unter gleichen experimentellen Bedingungen ermittelt wurden (Van Regenmortel, 2003). Dieser Effekt ließ sich auch in anderen

Messungen von Protein-Protein-Interaktionen mit SPR nachweisen: Eine groß angelegte Studie, in der unterschiedliche Labore die Interaktion eines Antigen mit einem AK quantitativ mittels der SPR bestimmen sollten, lieferte eine große Streubreite der Messwerte (Rich et al., 2009). Dies lässt sich mithilfe der folgenden Gleichung zur Bestimmung des maximalen Bindungssignals erklären (Di Primo et al., 2007):

$$RU_{\text{Max}} = RU_{\text{B}} * \frac{MW_{\text{A}}}{MW_{\text{B}}} * \frac{(\Delta n / \Delta c)_{\text{A}}}{(\Delta n / \Delta c)_{\text{B}}}$$

In diesem Zusammenhang beschreiben RU_{Max} das maximale SPR-Signal und RU_{B} die Menge des bindungsfähigen immobilisierten Liganden (jeweils in RU) sowie MW_{A} bzw. MW_{B} die Molekulargewichte für Analyt bzw. Ligand. Die beiden Terme $(\Delta n / \Delta c)_{\text{A}}$ und $(\Delta n / \Delta c)_{\text{B}}$ stehen für die Änderung des Brechungsindex n des Analyten (A) bzw. Liganden (B) an der Chipoberfläche in Abhängigkeit von der Konzentration c (Di Primo et al., 2007). Unter experimentellen Bedingungen hängt die Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen des immobilisierten Liganden (RU_{B}) nicht nur von der Immobilisationsmenge ab, sondern auch von der Größe des Liganden, etwaigen sterischen Wechselwirkungen und der Chiparchitektur (Di Primo et al., 2007). Die ursprüngliche Annahme, dass jedes immobilisierte Molekül für eine Bindung zur Verfügung steht, trifft demnach nicht zu. Außerdem variiert die Änderung des Brechungsindex $(\Delta n / \Delta c)$ durch die Lage der Proteine im Feld der OP (Di Primo et al., 2007). Aufgrund der genannten Unsicherheiten ist die Ermittlung vergleichbarer absoluter Affinitätswerte in unterschiedlichen Messungen nicht möglich, da die experimentellen Parameter sich verändern. Auch wenn dies zunächst als gravierender Nachteil der SPR erscheint, disqualifiziert sich die Messmethode für die Messung von Protein-Protein-Interaktionen dadurch nicht. Stattdessen folgt daraus, dass Messungen des Nr_{xn}/Nl_{gn}-Komplexes immer als direkte Vergleiche erfolgen sollten. Entweder Nr_{xn} oder Nl_{gn} wird auf dem Chip immobilisiert und unterschiedliche Proteinkonstrukte des Bindungspartners injiziert. Für die hier gezeigten K_{d} -Werte ist ein direkter Vergleich für das Experiment mit der LNS6 ohne Spleißeinfügung 4 und β -Nr_{xn} ohne Spleißeinfügung 4 zulässig, da gleiche experimentelle Konditionen vorlagen.

Im Zusammenhang mit diesen Überlegungen ist zu berücksichtigen, dass das Programm Scrubber die K_{d} -Werte aus dem Gleichgewichtszustand und damit dem maximalen Bindungssignal für diese Konzentration interpoliert. Entsprechend wiesen SPR-Experimente von Boucard et al. eine um 50% reduzierte Bindungsaffinität der LNS6 durch das Einfügen der Spleißeinfügung 4 nach (Boucard et al., 2005). Alternativ befindet sich Nr_{xn} möglicherweise in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Konformationen, die eine Interaktion mit Nl_{gn} entweder ermöglichen oder verhindern (Reissner et al., 2013). Treffen die Nr_{xn} und Nl_{gn}, wie

in der SPR, nur für einige min aufeinander, liegt nicht das gesamte Nrxn mit Spleißeinfügung 4 in bindungsfähiger Konformation vor mit der Folge einer vermeintlich schlechteren Affinität (Reissner et al., 2013). Diese Überlegungen sollten Anlass dazu sein, die Komplexbildung in Nrxn über einen längeren Zeitraum zu beobachten und dadurch zwischen den beiden Hypothesen zu differenzieren.

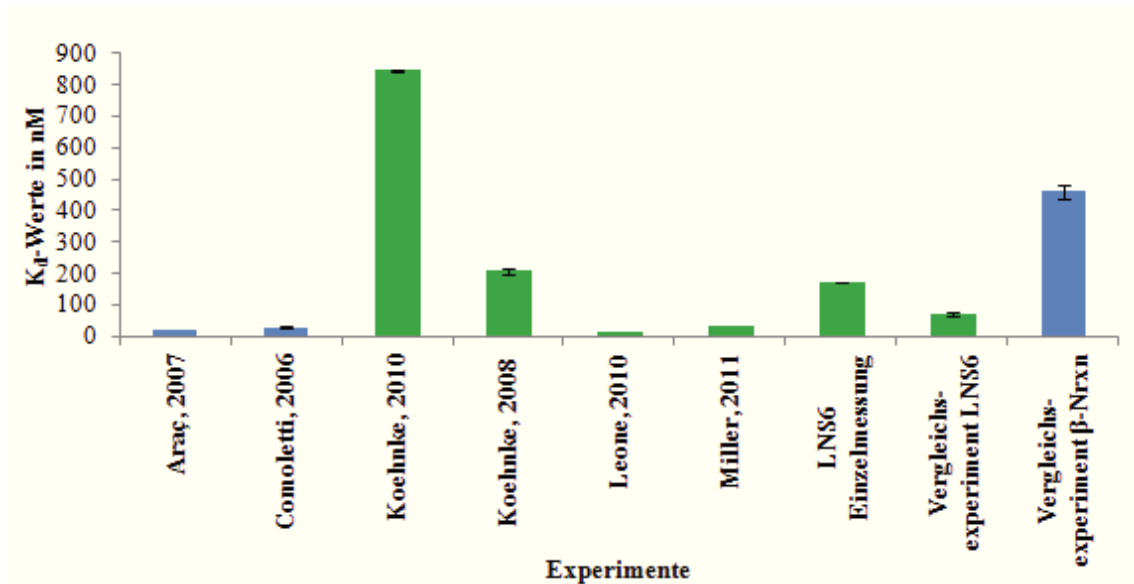


Abb. 23: K_a-Werte der Interaktion zwischen NlgnΔB und der LNS6/β-Nrxn im Vergleich. Die Abbildung zeigt die K_a-Werte in nM der verschiedenen Referenzarbeiten. Hierbei werden sowohl Experimente mit β-Nrxn (blau), als auch mit der LNS6 (grün) aufgeführt. Fehlerbalken, sofern in den Arbeiten angegeben.

Im Folgenden vergleiche ich die hier ermittelte SPR-Signalkurve mit anderen Experimenten zur β-Nrxn/Nlgn-Interaktion (Araç et al., 2007; Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006). In den Referenzexperimente ließen sich teilweise vergleichbare Kurvenverläufe für β-Nrxn nachweisen mit einem langen Abfall des SPR-Signals in der Dissoziationsphase (Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006). Auch eine langsame Assoziationskurve, die selbst nach 150 s keinen Gleichgewichtszustand erreichte, wurde beobachtet (Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006). Eine andere Arbeit demonstrierte eine langsame Bildung des Komplexes bei niedrigeren Konzentrationen, während höhere Konzentrationen eine deutlich schnellere Assoziation innerhalb von 50 s aufwiesen (Comoletti et al., 2006). Hierzu passen Ergebnisse eines weiteren Experiments (Araç et al., 2007). Jedoch wies letztgenannte Arbeit nur eine rasche initiale Dissoziation eines Großteils der Bindung auf, während im weiteren Verlauf keine weitere Dissoziation erfolgte und das SPR-Signal auf einem Plateau stehen blieb (Araç et al.,

2007). Dies erscheint fragwürdig, da bei der Dissoziation eigentlich eine kontinuierliche Abnahme des Signals zu erwarten ist (s. Abb. 17, 18). Zusammenfassend bekräftigen die Sensogramme der Referenzliteratur, unter Berücksichtigung eines ähnlichen Konzentrationsbereiches (Comoletti et al., 2003; Comoletti et al., 2006), die von mir gemessene Signalkurve des β -Nrxn und sind mit den Überlegungen zur Interaktion vereinbar.

In Zukunft sollte die bisherige Verallgemeinerung der LNS6 als „ β -Nrxn“ unterbleiben, da die beiden Proteine ein unterschiedliches Verhalten in der SPR aufweisen. Mithilfe des dargelegten Bindungsmodells lassen sich die Unterschiede zwischen β -Nrxn und der LNS6 gut erklären. Hiervon ausgehend soll nun die SPR-Messung mit α -Nrxn in das beschriebene Modell einbezogen werden.

4.5 α -Nrxn – Limitationen und Perspektiven des Bindungsassays

Das abschließend durchgeführte Experiment mit α -Nrxn sollte als Vergleichsmessung mit β -Nrxn dienen und so das Bindungsmodell der Nrxn erweitern. In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung von Nlgn an α -Nrxn in pulldown Experimenten (Reissner et al., 2008) und SPR-Messungen (Boucard et al., 2005; Comoletti et al., 2010; Miller et al., 2011) nachweisbar ist. Leider ließ sich das ursprüngliche Vorhaben einer genauen quantitativen Bestimmung verschiedener α -Nrxn/Nlgn-Interaktionspaare nicht umsetzen. Einerseits lag dies an der bereits erwähnten geringen Konzentration der Proteine bei der Messung. Andererseits muss α -Nrxn eine Konformationsänderung für die Bindung postsynaptischer Proteine wie Nlgn vollführen: Die L-förmige Struktur des α -Nrxn, in der die EGF2 und LNS2-5 den langen Schenkel und EGF3 sowie LNS6 den kurzen Schenkel bilden, wandelt sich mithilfe von Drehbewegungen in der Scharnierregion zwischen der LNS5 und der EGF3 in eine lineare Konfiguration um und ermöglicht so die Bindung (Chen et al., 2011; Miller et al., 2011). Obwohl nur moderate strukturelle Änderungen notwendig sind, ergibt sich eine zusätzliche Verschlechterung der Interaktion, da Energie benötigt wird, um Nrxn in eine bindungsfähige Konformation zu überführen (Miller et al., 2011). Dies erklärt, warum die Bindung des α -Nrxn an Nlgn Δ B nur $\frac{1}{4}$ der Stärke der Bindung von β -Nrxn ohne Spleißefügung 4 besitzt (Boucard et al., 2005). Insofern ist das hier vorgestellte α -Nrxn-Experiment durch die niedrige Bindungsaffinität des α -Nrxn und die geringen Konzentration limitiert. Welche Implikationen ergeben sich für zukünftige α -Nrxn Experimente? Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargelegt, sollten größere Materialmengen verwendet werden, um höhere Konzentration zu erhalten. Alternativ ließe sich ein effizienteres Expressionssystem verwenden, das größere Proteinnmengen bereitstellen kann. Miller et al. begegneten diesem Problem, indem sie direkt den Mediumüberstand aus HEK293-Zellen auf den SPR-Messchip

injizierten (Miller et al., 2011). Dieses Verfahren führt zwar zu einem höheren SPR-Signal, birgt jedoch gleichzeitig die Gefahr unspezifischer Interaktionen.

Insgesamt steht eine umfassende Bestimmung der Kinetik- und Affinitätswerte der Interaktion von α -Nrxn mit Nlgn noch aus. Die bisherigen Ergebnisse aus der Literatur und dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die vorgestellten Messprotokolle für die SPR-Messungen geeignet sind diese Experimente in Zukunft durchzuführen.

5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die SPR-Methode eine experimentelle Methode ist, die sich gut für die Interaktionsmessung des Nr₁xn/Nlgn-Komplexes eignet. Mithilfe des neu etablierten Protokolls sind nun Bindungsassays mit Geräten der Fa. Reichert in standardisierter Weise möglich. Ein Beispiel für die Anwendung ist der hier durchgeführte Vergleich zwischen LNS6 und β -Nr₁xn, der hochwertige Daten erbrachte und eine starke inhibierende Wirkung der β -spezifischen Sequenz nachwies. Zukünftige Experimente können auf dieser Messung aufbauen und z.B. die Frage adressieren, ob die Auswirkungen des N-Terminus durch die AS- Sequenz bestimmt werden oder Folge sterischer Wechselwirkungen sind. Hierzu sollte ein Vergleich zwischen β -Nr₁xn und einem modifizierten Protein erfolgen, das eine zufällige AS-Folge anstelle der 37 spezifischen Reste enthält. Des Weiteren können zusätzliche SPR-Messungen prüfen, ob β -Nr₁xn mithilfe seiner spezifischen Sequenz mit bisher unbekanntem Bindungspartnern interagiert oder dimerisiert. Außerdem sollten im Tiermodell mithilfe von Mäusen, denen die spezifischen AS des β -Nr₁xn fehlen, die funktionellen Auswirkungen des N-Terminus *in vivo* charakterisiert werden.

Im Gegensatz zu den bekannten SPR-Signalverläufen des β -Nr₁xn, steht eine genaue Messung des vollständigen α -Nr₁xn noch aus. Jedoch bin ich überzeugt, dass mithilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Einsichten eine derartige Messung zukünftig realisierbar sein wird. Aufgrund ihrer deutlich komplexeren Struktur bieten die α -Nr₁xn auch zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten für SPR-Messungen. Hierzu zählt das möglicherweise regulatorische Zusammenspiel zwischen der Spleißeinfügung 3 des α -Nr₁xn und der benachbarten Spleißeinfügung A des Nlgn, die Nlgn an inhibitorischen Synapsen konzentriert (Chen et al., 2011; Chih et al., 2006; Miller et al., 2011). Ein weiterer, lohnender Aspekt ist die Bestimmung der Affinität zwischen α -Nr₁xn und Nlgn2, da die bisherigen Experimente eine funktionelle Interaktion an inhibitorischen Synapsen nahelegen: Postsynaptisch wird Nlgn2 stark an inhibitorischen Synapsen exprimiert (Chih et al., 2005; Levinson et al., 2010; Varoqueaux et al., 2004) und erhöhte in Überexpression ganz besonders die Anzahl und Funktion dieser Synapsen, während ein knock-out die Anzahl und Funktion reduzierte (Chih et al., 2005; Chubykin et al., 2007). Analog zu diesen Befunden, rief α -Nr₁xn in Zellkultur auf benachbarten Neuronen inhibitorische Differenzierungen hervor (Chih et al., 2006; Kang et al., 2008).

Insgesamt bieten sich zahlreiche, herausfordernde Anwendungen für die SPR-Technologie im Bezug auf den Nr₁xn/Nlgn-Komplex. Die dabei ermittelten Daten werden eine genauere Charakterisierung der Interaktion ermöglichen und so den Kenntnisstand über die Bindung vergrößern. In diesem Sinne hoffe ich mit dieser Arbeit einen kleinen Mosaikstein zum Gesamtbild des Komplexes hinzugefügt zu haben.

Widmung

Für meine Familie

„Als ich ein junger Mann war, merkte ich, dass von zehn Dingen, die ich tat, neun fehlschlügen. Ich wollte kein Versager sein und arbeitete zehnmal so viel.“

George Bernhard Shaw

Danksagung

Zuerst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Markus Missler bedanken, der mir die Möglichkeit gab, als erster medizinischer Doktorand in Münster bei ihm zu promovieren. In zahlreichen fachlichen Gesprächen hat er meine fruchtbare Auseinandersetzung mit der Thematik sehr gefördert und mich bei der Durchführung dieses Projekts stets unterstützt.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Carsten Reissner, der mir als Betreuer bei Rückfragen stets hilfsbereit und mit vollem Einsatz zur Seite stand. Der mich bei Fehlschlägen motivieren konnte und diese Arbeit mit konstruktiver Kritik begleitet hat. Ebenso möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Martin Klose für die Ratschläge und Unterstützung im Umgang mit der SPR-Methode und der Etablierung des Messprotokolls danken. Ilka Wolf und Kai Kerkhoff möchte ich für die Unterstützung bei Fragen zu experimentellen Abläufen und die Bereitstellung exzellenter Materialien danken. Zusammenfassend gilt mein Dank der gesamten AG Missler, die mich während meines Forschungssemesters und darüber hinaus überaus freundlich aufgenommen hat. Es hat mir, trotz Fehlschlägen, viel Spaß gemacht, bei euch im Labor zu arbeiten.

Eine besondere Danksagung möchte ich weiterhin meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern, aussprechen. Nur durch ihre jahrelange Unterstützung habe ich es überhaupt bis hierhin schaffen können. Danke für eure Liebe und dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Katharina danke ich für ihre Liebe und ihren Zuspruch zu jeder Zeit.

Allen meinen Freunden, insbesondere Matthias und Steffen, möchte ich für ihre jahrelange Freundschaft danken.

Zum Schluss möchte ich noch Herrn PD Dr. med. Guido Trenn dafür danken, dass er meine Begeisterung für die Medizin hat wecken und vermehren können.

Literatur

- Araç, D., Boucard, A.A., Ozkan, E., Strop, P., Newell, E., Südhof, T.C., und Brunger, A.T. (2007). Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 β complex reveal specific protein-protein and protein-Ca²⁺ interactions. *Neuron* 56: 992-1003.
- Asperger, H. (1943). Die „Autistischen Psychopathen“ im Kindesalter. In *Kinderklinik, Universitätsklinikum Wien* (Wien).
- Atasoy, D., Schoch, S., Ho, A., Nadasy, K.A., Liu, X., Zhang, W., Mukherjee, K., Nosyreva, E.D., Fernandez-Chacon, R., Missler, M., Kavalali, E.T., und Südhof, T.C. (2007). Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2525-2530.
- Azevedo, F.A., Carvalho, L.R., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E., Leite, R.E., Jacob Filho, W., Lent, R., und Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology* 513: 532-541.
- Barbu, E.M., Ganesh, V.K., Gurusiddappa, S., Mackenzie, R.C., Foster, T.J., Südhof, T.C., und Hook, M. (2010). β -Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. *PLoS Pathog* 6: e1000726.
- Bell, J.E., Bell, E. T. (1988). *Proteins and Enzymes*, 1. Auflage (Englewood Cliffs, New Jersey (USA): Prentice-Hall Incorporation (zu Simon & Schuster)).
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., und Gaiarsa, J.L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 416: 303-325.
- Benson, D.L., Colman, D.R., und Huntley, G.W. (2001). Molecules, maps and synapse specificity. *Nature Reviews. Neuroscience* 2: 899-909.

Berninghausen, O., Rahman, M.A., Silva, J.P., Davletov, B., Hopkins, C., und Ushkaryov, Y.A. (2007). Neurexin I β and neuroligin are localized on opposite membranes in mature central synapses. *Journal of Neurochemistry* 103: 1855-1863.

Bierut, L.J., Madden, P.A., Breslau, N., Johnson, E.O., Hatsukami, D., Pomerleau, O.F., Swan, G.E., Rutter, J., Bertelsen, S., Fox, L., Fugman, D., Goate, A.M., Hinrichs, A.L., Konvicka, K., Martin, N.G., Montgomery, G.W., Saccone, N.L., Saccone, S.F., Wang, J.C., Chase, G.A., Rice, J.P., und Ballinger, D.G. (2007). Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Human Molecular Genetics* 16: 24-35.

Blum, H.E., Dichigans, J., Kaminsky, W. (Hrg., 2006). Wachstum und Alter- Von den Chancen und Lasten des Lebenszyklus; über die Arbeit der Jung-Stiftung für Wissenschaft und Forschung in den Jahren 2004 und 2005 Publikation der Jung-Stiftung für Wissenschaft und Forschung , Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Bolliger, M.F., Frei, K., Winterhalter, K.H., und Gloor, S.M. (2001). Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *The Biochemical Journal* 356: 581-588.

Bottos, A., Destro, E., Rissone, A., Graziano, S., Cordara, G., Assenzio, B., Cera, M.R., Mascia, L., Bussolino, F., und Arese, M. (2009). The synaptic proteins neurexins and neuroligins are widely expressed in the vascular system and contribute to its functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 20782-20787.

Boucard, A.A., Chubykin, A.A., Comoletti, D., Taylor, P., und Südhof, T.C. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to α - and β -neurexins. *Neuron* 48: 229-236.

Brange, J., und Langkjoer, L. (1993). Insulin structure and stability. *Pharmaceutical Biotechnology* 5: 315-350.

Brose, N. (1999). Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system. *Die Naturwissenschaften* 86: 516-524.

Butz, S., Okamoto, M., und Südhof, T.C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* 94: 773-782.

Chen, F., Venugopal, V., Murray, B., und Rudenko, G. (2011). The structure of neurexin 1 α reveals features promoting a role as synaptic organizer. *Structure* 19: 779-789.

Chen, X., Liu, H., Shim, A.H., Focia, P.J., und He, X. (2008). Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions. *Nature Structural & Molecular Biology* 15: 50-56.

Chih, B., Afridi, S.K., Clark, L., und Scheiffele, P. (2004). Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Human Molecular Genetics* 13: 1471-1477.

Chih, B., Engelman, H., und Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307: 1324-1328.

Chih, B., Gollan, L., und Scheiffele, P. (2006). Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* 51: 171-178.

Ching, M.S., Shen, Y., Tan, W.H., Jeste, S.S., Morrow, E.M., Chen, X., Mukaddes, N.M., Yoo, S.Y., Hanson, E., Hundley, R., Austin, C., Becker, R.E., Berry, G.T., Driscoll, K., Engle, E.C., Friedman, S., Gusella, J.F., Hisama, F.M., Irons, M.B., Lafiosca, T., LeClair, E., Miller, D.T., Neessen, M., Picker, J.D., Rappaport, L., Rooney, C.M., Sarco, D.P., Stoler, J.M., Walsh, C.A., Wolff, R.R., Zhang, T., Nasir, R.H., und Wu, B.L. (2010). Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B: 937-947.

Chubykin, A.A., Liu, X., Comoletti, D., Tsigelny, I., Taylor, P., und Südhof, T.C. (2005). Dissection of synapse induction by neuroligins: effect of a neuroligin mutation associated with autism. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 22365-22374.

Chubykin, A.A., Atasoy, D., Etherton, M.R., Brose, N., Kavalali, E.T., Gibson, J.R., und Südhof, T.C. (2007). Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54: 919-931.

Comoletti, D., Flynn, R., Jennings, L.L., Chubykin, A., Matsumura, T., Hasegawa, H., Südhof, T.C., und Taylor, P. (2003). Characterization of the interaction of a recombinant soluble neuroligin-1 with neurexin-1 β . *The Journal of Biological Chemistry* 278: 50497-50505.

Comoletti, D., De Jaco, A., Jennings, L.L., Flynn, R.E., Gaietta, G., Tsigelny, I., Ellisman, M.H., und Taylor, P. (2004). The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing. *Journal of Neuroscience: The official journal of the Society for Neuroscience* 24: 4889-4893.

Comoletti, D., Flynn, R.E., Boucard, A.A., Demeler, B., Schirf, V., Shi, J., Jennings, L.L., Newlin, H.R., Südhof, T.C., und Taylor, P. (2006). Gene selection, alternative splicing, and post-translational processing regulate neuroligin selectivity for β -neuexins. *Biochemistry* 45: 12816-12827.

Comoletti, D., Grishaev, A., Whitten, A.E., Tsigelny, I., Taylor, P., und Trewhella, J. (2007). Synaptic arrangement of the neuroligin/ β -neuexin complex revealed by X-ray and neutron scattering. *Structure* 15: 693-705.

Comoletti, D., Grishaev, A., Whitten, A.E., Taylor, P., und Trewhella, J. (2008). Characterization of the solution structure of a neuroligin/ β -neuexin complex. *Chemico-Biological Interactions* 175: 150-155.

Comoletti, D., Miller, M.T., Jeffries, C.M., Wilson, J., Demeler, B., Taylor, P., Trewhella, J., und Nakagawa, T. (2010). The macromolecular architecture of extracellular domain of α NRXN1: domain organization, flexibility, and insights into trans-synaptic disposition. *Structure* 18: 1044-1053.

Cun, S., Lai, Y.T., Chang, Y.Y., und Sun, H. (2013). Structure-oriented bioinformatic approach exploring histidine-rich clusters in proteins. *Metallomics: integrated biometal science* 5: 904-912.

Dahlhaus, R., Hines, R.M., Eadie, B.D., Kannangara, T.S., Hines, D.J., Brown, C.E., Christie, B.R., und El-Husseini, A. (2010). Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus. *Hippocampus* 20: 305-322.

de Crescenzo, G., Boucher, C., Durocher, Y., Jolicoeur, M. (2008). Kinetic Characterization by Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors: Principle and Emerging Trends. *Cellular and Molecular Bioengineering 1*: 204–215.

De Jaco, A., Comoletti, D., Kovarik, Z., Gaietta, G., Radic, Z., Lockridge, O., Ellisman, M.H., und Taylor, P. (2006). A mutation linked with autism reveals a common mechanism of endoplasmic reticulum retention for the α,β -hydrolase fold protein family. *The Journal of Biological Chemistry 281*: 9667-9676.

de Wit, J., Sylwestrak, E., O'Sullivan, M.L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J.N., Yates, J.R., 3rd, Comoletti, D., Taylor, P., und Ghosh, A. (2009). LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron 64*: 799-806.

Dean, C., Scholl, F.G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., und Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience 6*: 708-716.

Di Primo, C., und Lebars, I. (2007). Determination of refractive index increment ratios for protein-nucleic acid complexes by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry 368*: 148-155.

DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Courchesne, E., Dager, S.R., Schmitz, C., Schultz, R.T., Crawley, J., und Young, L.J. (2006). The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 26*: 6897-6906.

Docampo, E., Ribases, M., Gratacos, M., Bruguera, E., Cabezas, C., Sanchez-Mora, C., Nieva, G., Puente, D., Argimon-Pallas, J.M., Casas, M., Rabionet, R., und Estivill, X. (2012). Association of neurexin 3 polymorphisms with smoking behavior. *Genes, Brain, and Behavior 11*: 704-711.

Dose, M. (2010). Das Asperger-Syndrom. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie 78*: 233-241.

Dudanova, I., Sedej, S., Ahmad, M., Masius, H., Sargsyan, V., Zhang, W., Riedel, D., Angenstein, F., Schild, D., Rupnik, M., und Missler, M. (2006). Important contribution of α -neurexins to Ca^{2+} -triggered exocytosis of secretory granules. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 10599-10613.

Dudanova, I., Tabuchi, K., Rohlmann, A., Südhof, T.C., und Missler, M. (2007). Deletion of α -neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation. *The Journal of Comparative Neurology* 502: 261-274.

Elste, A.M., und Benson, D.L. (2006). Structural basis for developmentally regulated changes in cadherin function at synapses. *The Journal of Comparative Neurology* 495: 324-335.

Etherton, M.R., Blaiss, C.A., Powell, C.M., und Südhof, T.C. (2009). Mouse neurexin-1 α deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 17998-18003.

Fabrichny, I.P., Leone, P., Sulzenbacher, G., Comoletti, D., Miller, M.T., Taylor, P., Bourne, Y., und Marchot, P. (2007). Structural analysis of the synaptic protein neuroligin and its β -neurexin complex: determinants for folding and cell adhesion. *Neuron* 56: 979-991.

Fairless, R., Masius, H., Rohlmann, A., Heupel, K., Ahmad, M., Reissner, C., Dresbach, T., und Missler, M. (2008). Polarized targeting of neurexins to synapses is regulated by their C-terminal sequences. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 12969-12981.

Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., Cook, E.H., Jr., Skinner, C., Schwartz, C.E., und Sommer, S.S. (2006). High frequency of neurexin 1 β signal peptide structural variants in patients with autism. *Neuroscience Letters* 409: 10-13.

Frederickson, C.J., Suh, S.W., Silva, D., Frederickson, C.J., und Thompson, R.B. (2000). Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of Nutrition* 130: 1471S-1483S.

Fu, Y., und Huang, Z.J. (2010). Differential dynamics and activity-dependent regulation of α - and β -neurexins at developing GABAergic synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 22699-22704.

Fu, Z., und Vicini, S. (2009). Neuroligin-2 accelerates GABAergic synapse maturation in cerebellar granule cells. *Molecular and Cellular Neurosciences* 42: 45-55.

Geppert, M., Khvotchev, M., Krasnoperov, V., Goda, Y., Missler, M., Hammer, R.E., Ichtchenko, K., Petrenko, A.G., und Südhof, T.C. (1998). Neurexin I α is a major α -latrotoxin receptor that cooperates in α -latrotoxin action. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 1705-1710.

Gerrow, K., und El-Husseini, A. (2006). Cell adhesion molecules at the synapse. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library* 11: 2400-2419.

Gibson, J.R., Huber, K.M., und Südhof, T.C. (2009). Neuroligin-2 deletion selectively decreases inhibitory synaptic transmission originating from fast-spiking but not from somatostatin-positive interneurons. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 13883-13897.

Gjørnlund, M.D., Nielsen, J., Pankratova, S., Li, S., Korshunova, I., Bock, E., und Berezin, V. (2012). Neuroligin-1 induces neurite outgrowth through interaction with neurexin-1 β and activation of fibroblast growth factor receptor-1. *FASEB Journal* 26: 4174-4186.

Graf, E.R., Zhang, X., Jin, S.X., Linhoff, M.W., und Craig, A.M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119: 1013-1026.

Graf, E.R., Kang, Y., Hauner, A.M., und Craig, A.M. (2006). Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 β LNS domain. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 4256-4265.

Gray, E.G. (1959a). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of Anatomy* 93: 420-433.

Gray, E.G. (1959b). Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* *183*: 1592-1593.

Grayton, H.M., Missler, M., Collier, D.A., und Fernandes, C. (2013). Altered social behaviours in neurexin 1 α knockout mice resemble core symptoms in neurodevelopmental disorders. *PLoS One* *8*: e67114.

Haklai-Topper, L., Soutschek, J., Sabanay, H., Scheel, J., Hobert, O., und Peles, E. (2011). The neurexin superfamily of *Caenorhabditis elegans*. *Gene Expression Patterns II*: 144-150.

Hata, Y., Butz, S., und Südhof, T.C. (1996). CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* *16*: 2488-2494.

Heard-Costa, N.L., Zillikens, M.C., Monda, K.L., Johansson, A., Harris, T.B., Fu, M., Haritunians, T., Feitosa, M.F., Aspelund, T., Eiriksdottir, G., Garcia, M., Launer, L.J., Smith, A.V., Mitchell, B.D., McArdle, P.F., Shuldiner, A.R., Bielinski, S.J., Boerwinkle, E., Brancati, F., Demerath, E.W., Pankow, J.S., Arnold, A.M., Chen, Y.D., Glazer, N.L., McKnight, B., Psaty, B.M., Rotter, J.I., Amin, N., Campbell, H., Gyllensten, U., Pattaro, C., Pramstaller, P.P., Rudan, I., Struchalin, M., Vitart, V., Gao, X., Kraja, A., Province, M.A., Zhang, Q., Atwood, L.D., Dupuis, J., Hirschhorn, J.N., Jaquish, C.E., O'Donnell, C.J., Vasan, R.S., White, C.C., Aulchenko, Y.S., Estrada, K., Hofman, A., Rivadeneira, F., Uitterlinden, A.G., Witteman, J.C., Oostra, B.A., Kaplan, R.C., Gudnason, V., O'Connell, J.R., Borecki, I.B., van Duijn, C.M., Cupples, L.A., Fox, C.S., und North, K.E. (2009). NRXN3 is a novel locus for waist circumference: a genome-wide association study from the CHARGE Consortium. *PLoS Genetics* *5*: e1000539.

Hishimoto, A., Liu, Q.R., Drgon, T., Pletnikova, O., Walther, D., Zhu, X.G., Troncoso, J.C., und Uhl, G.R. (2007). Neurexin 3 polymorphisms are associated with alcohol dependence and altered expression of specific isoforms. *Human Molecular Genetics* *16*: 2880-2891.

Ho, A., Morishita, W., Hammer, R.E., Malenka, R.C., und Südhof, T.C. (2003). A role for Mints in transmitter release: Mint 1 knockout mice exhibit impaired GABAergic synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*: 1409-1414.

Homola, J. (2003). Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* *377*: 528-539.

Hoon, M., Soykan, T., Falkenburger, B., Hammer, M., Patrizi, A., Schmidt, K.F., Sassoe-Pognetto, M., Lowel, S., Moser, T., Taschenberger, H., Brose, N., und Varoqueaux, F. (2011). Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*: 3053-3058.

Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., und Südhof, T.C. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for β -neurexins. *Cell* *81*: 435-443.

Ichtchenko, K., Nguyen, T., und Südhof, T.C. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *The Journal of Biological Chemistry* *271*: 2676-2682.

Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., und Bourgeron, T. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics* *34*: 27-29.

Jason-Moller, L., Murphy, M., und Bruno, J. (2006). Overview of Biacore systems and their applications. *Current Protocols in Protein Science* *Chapter 19*: Unit 19 13.

Johnsson, B., Lofas, S., und Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry* *198*: 268-277.

Jung, L.S., Campbell, Charles T., Chinowsky, Timothy M., Mar, Mimi N., Yee, Sinclair S. Yee (1998). Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir* *14*: 5636-5648.

- Kahle, W., Frotscher M. (2005). Nervensystem und Sinnesorgane, Vol 3, 9., überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kang, Y., Zhang, X., Dobie, F., Wu, H., und Craig, A.M. (2008). Induction of GABAergic postsynaptic differentiation by α -neurexins. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 2323-2334.
- Kanner, L. (1943). Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nervous Child* 2: 217-250.
- Karlsson, R., und Fält, A. (1997). Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *Journal of Immunological Methods* 200: 121-133.
- Karlsson, R. (2004). SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *Journal of Molecular Recognition* 17: 151-161.
- Kastritis, P.L., und Bonvin, A.M. (2013). On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *Journal of the Royal Society, Interface* 10: 20120835.
- Kattenstroth, G., Tantalaki, E., Südhof, T.C., Gottmann, K., und Missler, M. (2004). Postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function requires α -neurexins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2607-2612.
- Kim, H.G., Kishikawa, S., Higgins, A.W., Seong, I.S., Donovan, D.J., Shen, Y., Lally, E., Weiss, L.A., Najm, J., Kutsche, K., Descartes, M., Holt, L., Braddock, S., Troxell, R., Kaplan, L., Volkmar, F., Klin, A., Tsatsanis, K., Harris, D.J., Noens, I., Pauls, D.L., Daly, M.J., MacDonald, M.E., Morton, C.C., Quade, B.J., und Gusella, J.F. (2008). Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics* 82: 199-207.
- Kiyatkin, E.A. (2010). Brain temperature homeostasis: physiological fluctuations and pathological shifts. *Frontiers in Bioscience* 15: 73-92.
- Kiyatkin, E.A. (2013). The hidden side of drug action: brain temperature changes induced by neuroactive drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 225: 765-780.

- Ko, J., Fuccillo, M.V., Malenka, R.C., und Südhof, T.C. (2009). LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron* 64: 791-798.
- Koehnke, J., Jin, X., Trbovic, N., Katsamba, P.S., Brasch, J., Ahlsen, G., Scheiffele, P., Honig, B., Palmer, A.G., 3rd, und Shapiro, L. (2008). Crystal structures of β -neurexin 1 and β -neurexin 2 ectodomains and dynamics of splice insertion sequence 4. *Structure* 16: 410-421.
- Koehnke, J., Katsamba, P.S., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Honig, B., Shapiro, L., und Jin, X. (2010). Splice form dependence of β -neurexin/neuroigin binding interactions. *Neuron* 67: 61-74.
- Kohl, C., Riccio, O., Grosse, J., Zanoletti, O., Fournier, C., Schmidt, M.V., und Sandi, C. (2013). Hippocampal neuroigin-2 overexpression leads to reduced aggression and inhibited novelty reactivity in rats. *PLoS One* 8: e56871.
- Laarakker, M.C., Reinders, N.R., Bruining, H., Ophoff, R.A., und Kas, M.J. (2012). Sex-dependent novelty response in neurexin-1 α mutant mice. *PLoS One* 7: e31503.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, H., Dean, C., und Isacoff, E. (2010). Alternative splicing of neuroigin regulates the rate of presynaptic differentiation. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 11435-11446.
- Lee, S.J., Uemura, T., Yoshida, T., und Mishina, M. (2012). GluRA2 assembles four neurexins into trans-synaptic triad to trigger synapse formation. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 4688-4701.
- Leone, P., Comoletti, D., Ferracci, G., Conrod, S., Garcia, S.U., Taylor, P., Bourne, Y., und Marchot, P. (2010). Structural insights into the exquisite selectivity of neurexin/neuroigin synaptic interactions. *The EMBO Journal* 29: 2461-2471.

Levinson, J.N., Chery, N., Huang, K., Wong, T.P., Gerrow, K., Kang, R., Prange, O., Wang, Y.T., und El-Husseini, A. (2005). Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1 β in neuroligin-induced synaptic specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 17312-17319.

Levinson, J.N., Li, R., Kang, R., Moukhles, H., El-Husseini, A., und Bamji, S.X. (2010). Postsynaptic scaffolding molecules modulate the localization of neuroligins. *Neuroscience* 165: 782-793.

Levy, S.E., Mandell, D.S., und Schultz, R.T. (2009). Autism. *Lancet* 374: 1627-1638.

Li, Z., und Sheng, M. (2003). Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4: 833-841.

Liu, Y., Hu, Z., Xun, G., Peng, Y., Lu, L., Xu, X., Xiong, Z., Xia, L., Liu, D., Li, W., Zhao, J., und Xia, K. (2012). Mutation analysis of the NRXN1 gene in a Chinese autism cohort. *Journal of Psychiatric Research* 46: 630-634.

Malmqvist, M., und Karlsson, R. (1997). Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 1: 378-383.

Matsuda, K., und Yuzaki, M. (2011). Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *The European Journal of Neuroscience* 33: 1447-1461.

Maximov, A., Südhof, T.C., und Bezprozvanny, I. (1999). Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 24453-24456.

Meyer, G., Varoqueaux, F., Neeb, A., Oschlies, M., und Brose, N. (2004). The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology* 47: 724-733.

Miller, M.T., Mileni, M., Comoletti, D., Stevens, R.C., Harel, M., und Taylor, P. (2011). The crystal structure of the α -neurexin-1 extracellular region reveals a hinge point for mediating synaptic adhesion and function. *Structure* 19: 767-778.

Missler, M., Fernandez-Chacon, R., und Südhof, T.C. (1998a). The making of neurexins. *Journal of Neurochemistry* 71: 1339-1347.

Missler, M., Hammer, R.E., und Südhof, T.C. (1998b). Neurexophilin binding to α -neurexins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 34716-34723.

Missler, M., und Südhof, T.C. (1998c). Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends in Genetics* 14: 20-26.

Missler, M., Zhang, W., Rohlmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R.E., Gottmann, K., und Südhof, T.C. (2003). α -neurexins couple Ca^{2+} channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423: 939-948.

Missler, M., Südhof, T.C., und Biederer, T. (2012). Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a005694.

Moller, R.S., Weber, Y.G., Klitten, L.L., Trucks, H., Muhle, H., Kunz, W.S., Mefford, H.C., Franke, A., Kautza, M., Wolf, P., Dennig, D., Schreiber, S., Ruckert, I.M., Wichmann, H.E., Ernst, J.P., Schurmann, C., Grabe, H.J., Tommerup, N., Stephani, U., Lerche, H., Hjalgrim, H., Helbig, I., und Sander, T. (2013). Exon-disrupting deletions of NRXN1 in idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 54: 256-264.

Mosedale, M., Egodage, S., Calma, R.C., Chi, N.W., und Chessler, S.D. (2012). Neurexin-1 α contributes to insulin-containing secretory granule docking. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 6350-6361.

Muhle, R., Trentacoste, S.V., und Rapin, I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics* 113: e472-486.

- Myszka, D.G. (1997). Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 50-57.
- Nguyen, T., und Südhof, T.C. (1997). Binding properties of neuroligin 1 and neurexin 1 β reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 26032-26039.
- Novak, G., Boukhadra, J., Shaikh, S.A., Kennedy, J.L., und Le Foll, B. (2009). Association of a polymorphism in the NRXN3 gene with the degree of smoking in schizophrenia: a preliminary study. *The World Journal of Biological Psychiatry: the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 10: 929-935.
- O'Shannessy, D.J. (1994). Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 65-71.
- Palay, S.L. (1956). Synapses in the central nervous system. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2: 193-202.
- Paoletti, P., Vergnano, A.M., Barbour, B., und Casado, M. (2009). Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158: 126-136.
- Pardo, C.A., und Eberhart, C.G. (2007). The neurobiology of autism. *Brain Pathology (Zürich)* 17: 434-447.
- Patel, R., und Andrien, B.A., Jr. (2010). Kinetic analysis of a monoclonal therapeutic antibody and its single-chain homolog by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry* 396: 59-68.
- Petrenko, A.G., Ullrich, B., Missler, M., Krasnoperov, V., Rosahl, T.W., und Südhof, T.C. (1996). Structure and evolution of neuroligin. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 4360-4369.

Pettem, K.L., Yokomaku, D., Luo, L., Linhoff, M.W., Prasad, T., Connor, S.A., Siddiqui, T.J., Kawabe, H., Chen, F., Zhang, L., Rudenko, G., Wang, Y.T., Brose, N., und Craig, A.M. (2013). The Specific α -Neurexin Interactor Calsyntenin-3 Promotes Excitatory and Inhibitory Synapse Development. *Neuron* 80: 113-128.

Piechotta, K., Dudanova, I., und Missler, M. (2006). The resilient synapse: insights from genetic interference of synaptic cell adhesion molecules. *Cell and Tissue Research* 326: 617-642.

Piliarik, M., Vaisocherova, H., und Homola, J. (2009). Surface plasmon resonance biosensing. *Methods in Molecular Biology (Clifton)* 503: 65-88.

Poulopoulos, A., Soykan, T., Tuffy, L.P., Hammer, M., Varoqueaux, F., und Brose, N. (2012). Homodimerization and isoform-specific heterodimerization of neuroligins. *The Biochemical Journal* 446: 321-330.

Prange, O., Wong, T.P., Gerrow, K., Wang, Y.T., und El-Husseini, A. (2004). A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 13915-13920.

Reissner, C., Klose, M., Fairless, R., und Missler, M. (2008). Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 15124-15129.

Reissner, C. (2009). Strukturbasierte Analyse calciumkoordinierender Proteine an der Synapse. Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Magdeburg), 125 Seiten.

Reissner, C., Runkel, F., und Missler, M. (2013). Neurexins. *Genome Biology* 14: 213.

Rich, R.L., und Myszka, D.G. (2000). Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 54-61.

- Rich, R.L., Papalia, G.A., Flynn, P.J., Furneisen, J., Quinn, J., Klein, J.S., Katsamba, P.S., Waddell, M.B., Scott, M., Thompson, J., Berlier, J., Corry, S., Baltzinger, M., Zeder-Lutz, G., Schoenemann, A., Clabbers, A., Wieckowski, S., Murphy, M.M., Page, P., Ryan, T.E., Duffner, J., Ganguly, T., Corbin, J., Gautam, S., Anderluh, G., Bavdek, A., Reichmann, D., Yadav, S.P., Hommema, E., Pol, E., Drake, A., Klakamp, S., Chapman, T., Kernaghan, D., Miller, K., Schuman, J., Lindquist, K., Herlihy, K., Murphy, M.B., Bohnsack, R., Andrien, B., Brandani, P., Terwey, D., Millican, R., Darling, R.J., Wang, L., Carter, Q., Dotzlaf, J., Lopez-Sagaseta, J., Campbell, I., Torreri, P., Hoos, S., England, P., Liu, Y., Abdiche, Y., Malashock, D., Pinkerton, A., Wong, M., Lafer, E., Hinck, C., Thompson, K., Primo, C.D., Joyce, A., Brooks, J., Torta, F., Bagge Hagel, A.B., Krarup, J., Pass, J., Ferreira, M., Shikov, S., Mikolajczyk, M., Abe, Y., Barbato, G., Giannetti, A.M., Krishnamoorthy, G., Beusink, B., Satpaev, D., Tsang, T., Fang, E., Partridge, J., Brohawn, S., Horn, J., Pritsch, O., Obal, G., Nilapwar, S., Busby, B., Gutierrez-Sanchez, G., Gupta, R.D., Canepa, S., Witte, K., Nikolovska-Coleska, Z., Cho, Y.H., D'Agata, R., Schlick, K., Calvert, R., Munoz, E.M., Hernaiz, M.J., Bravman, T., Dines, M., Yang, M.H., Puskas, A., Boni, E., Li, J., Wear, M., Grinberg, A., Baardsnes, J., Dolezal, O., Gainey, M., Anderson, H., Peng, J., Lewis, M., Spies, P., Trinh, Q., Bibikov, S., Raymond, J., Yousef, M., Chandrasekaran, V., Feng, Y., Emerick, A., Mundodo, S., Guimaraes, R., McGirr, K., Li, Y.J., Hughes, H., Mantz, H., Skrabana, R., Witmer, M., Ballard, J., Martin, L., Skladal, P., Korza, G., Laird-Offringa, I., Lee, C.S., Khadir, A., Podlaski, F., Neuner, P., Rothacker, J., Rafique, A., Dankbar, N., Kainz, P., Gedig, E., Vuyisich, M., Boozer, C., Ly, N., Toews, M., Uren, A., Kalyuzhniy, O., Lewis, K., Chomey, E., Pak, B.J., und Myszka, D.G. (2009). A global benchmark study using affinity-based biosensors. *Analytical Biochemistry* 386: 194-216.
- Rowen, L., Young, J., Birditt, B., Kaur, A., Madan, A., Philipps, D.L., Qin, S., Minx, P., Wilson, R.K., Hood, L., und Graveley, B.R. (2002). Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics* 79: 587-597.
- Rubenstein, J.L., und Merzenich, M.M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain, and Behavior* 2: 255-267.
- Rudenko, G., Nguyen, T., Chelliah, Y., Südhof, T.C., und Deisenhofer, J. (1999). The structure of the ligand-binding domain of neurexin I β : regulation of LNS domain function by alternative splicing. *Cell* 99: 93-101.

Runkel, F., Rohlmann, A., Reissner, C., Brand, S.M., und Missler, M. (2013). Promoter-like sequences regulating transcriptional activity in neurexin and neuroligin genes. *Journal of Neurochemistry* 127: 36-47.

Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., und Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101: 657-669.

Sensi, S.L., Paoletti, P., Koh, J.Y., Aizenman, E., Bush, A.I., und Hershfinkel, M. (2011). The neurophysiology and pathology of brain zinc. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 16076-16085.

Shen, K., und Scheiffele, P. (2010). Genetics and cell biology of building specific synaptic connectivity. *Annual Review of Neuroscience* 33: 473-507.

Siddiqui, T.J., Pancaroglu, R., Kang, Y., Rooyackers, A., und Craig, A.M. (2010). LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 7495-7506.

Soler-Llavina, G.J., Fuccillo, M.V., Ko, J., Südhof, T.C., und Malenka, R.C. (2011). The neurexin ligands, neuroligins and leucine-rich repeat transmembrane proteins, perform convergent and divergent synaptic functions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 16502-16509.

Song, J.Y., Ichtchenko, K., Südhof, T.C., und Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1100-1105.

Sons, M.S., Busche, N., Strenzke, N., Moser, T., Ernsberger, U., Mooren, F.C., Zhang, W., Ahmad, M., Steffens, H., Schomburg, E.D., Plomp, J.J., und Missler, M. (2006). α -Neurexins are required for efficient transmitter release and synaptic homeostasis at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 138: 433-446.

- Stoltenberg, S.F., Lehmann, M.K., Christ, C.C., Hersrud, S.L., und Davies, G.E. (2011). Associations among types of impulsivity, substance use problems and neurexin-3 polymorphisms. *Drug and Alcohol Dependence 119*: e31-38.
- Suckow, A.T., Comoletti, D., Waldrop, M.A., Mosedale, M., Egodage, S., Taylor, P., und Chessler, S.D. (2008). Expression of neurexin, neuroligin, and their cytoplasmic binding partners in the pancreatic β -cells and the involvement of neuroligin in insulin secretion. *Endocrinology 149*: 6006-6017.
- Südhof, T.C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature 455*: 903-911.
- Sugita, S., Khvochtev, M., und Südhof, T.C. (1999). Neurexins are functional α -latrotoxin receptors. *Neuron 22*: 489-496.
- Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., und Südhof, T.C. (2001). A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *The Journal of Cell Biology 154*: 435-445.
- Sun, C., Cheng, M.C., Qin, R., Liao, D.L., Chen, T.T., Koong, F.J., Chen, G., und Chen, C.H. (2011). Identification and functional characterization of rare mutations of the neuroligin-2 gene (NLGN2) associated with schizophrenia. *Human Molecular Genetics 20*: 3042-3051.
- Tabuchi, K., und Südhof, T.C. (2002). Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics 79*: 849-859.
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M.R., Hammer, R.E., Liu, X., Powell, C.M., und Südhof, T.C. (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science 318*: 71-76.
- Tanaka, H., Nogi, T., Yasui, N., Iwasaki, K., und Takagi, J. (2011). Structural basis for variant-specific neuroligin-binding by α -neurexin. *PLoS One 6*: e19411.
- Tanaka, H., Miyazaki, N., Matoba, K., Nogi, T., Iwasaki, K., und Takagi, J. (2012). Higher-order architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neurexin and neuroligin. *Cell Reports 2*: 101-110.

Taniguchi, H., Gollan, L., Scholl, F.G., Mahadomrongkul, V., Dobler, E., Limthong, N., Peck, M., Aoki, C., und Scheiffele, P. (2007). Silencing of neuroligin function by postsynaptic neurexins. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 2815-2824.

Torreri, P., Ceccarini, M., Macioce, P., und Petrucci, T.C. (2005). Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 41: 437-441.

Uemura, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., und Mishina, M. (2010). Trans-synaptic interaction of GluR Δ 2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell* 141: 1068-1079.

Ullrich, B., Ushkaryov, Y.A., und Südhof, T.C. (1995). Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* 14: 497-507.

US National Library of Medicine, N.I.o.H. (2013). Autistic Disorder. In *Medical Subject Headings (MeSH)*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68001321>.

Ushkaryov, Y.A., Petrenko, A.G., Geppert, M., und Südhof, T.C. (1992). Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the α -latrotoxin receptor and laminin. *Science* 257: 50-56.

Ushkaryov, Y.A., und Südhof, T.C. (1993). Neurexin III α : extensive alternative splicing generates membrane-bound and soluble forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6410-6414.

Ushkaryov, Y.A., Hata, Y., Ichtchenko, K., Moomaw, C., Afendis, S., Slaughter, C.A., und Südhof, T.C. (1994). Conserved domain structure of β -neurexins. Unusual cleaved signal sequences in receptor-like neuronal cell-surface proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 11987-11992.

Van Regenmortel, M.H. (1994). Use of biosensors to characterize recombinant proteins. *Developments in Biological Standardization* 83: 143-151.

- Van Regenmortel, M.H. (2003). Improving the quality of BIACORE-based affinity measurements. *Developments in Biologicals (Basel) 112*: 141-151.
- Varoquaux, F., Jamain, S., und Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European Journal of Cell Biology 83*: 449-456.
- Varoquaux, F., Aramuni, G., Rawson, R.L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Südhof, T.C., und Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron 51*: 741-754.
- Vashist, S.K. (2012). Effect of antibody modifications on its biomolecular binding as determined by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry 421*: 336-338.
- Wheeler, D.B., Randall, A., und Tsien, R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science 264*: 107-111.
- Willander, M., und Al-Hilli, S. (2009). Analysis of biomolecules using surface plasmons. *Methods in Molecular Biology (Clifton) 544*: 201-229.
- Yamagata, M., Sanes, J.R., und Weiner, J.A. (2003). Synaptic adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology 15*: 621-632.
- Ylisaukko-oja, T., Rehnstrom, K., Auranen, M., Vanhala, R., Alen, R., Kempas, E., Ellonen, P., Turunen, J.A., Makkonen, I., Riikonen, R., Nieminen-von Wendt, T., von Wendt, L., Peltonen, L., und Jarvela, I. (2005). Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. *European Journal of Human Genetics 13*: 1285-1292.
- Zhang, C., Milunsky, J.M., Newton, S., Ko, J., Zhao, G., Maher, T.A., Tager-Flusberg, H., Bolliger, M.F., Carter, A.S., Boucard, A.A., Powell, C.M., und Südhof, T.C. (2009). A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 29*: 10843-10854.

Zhang, C., Atasoy, D., Araç, D., Yang, X., Fucillo, M.V., Robison, A.J., Ko, J., Brunger, A.T., und Südhof, T.C. (2010). Neurexins physically and functionally interact with GABA(A) receptors. *Neuron* 66: 403-416.

Zhang, Q., Wang, J., Li, A., Liu, H., Zhang, W., Cui, X., und Wang, K. (2013). Expression of neurexin and neuroligin in the enteric nervous system and their down-regulated expression levels in Hirschsprung disease. *Molecular Biology Reports* 40: 2969-2975.

Zhang, W., Rohlmann, A., Sargsyan, V., Aramuni, G., Hammer, R.E., Südhof, T.C., und Missler, M. (2005). Extracellular domains of α -neurexins participate in regulating synaptic transmission by selectively affecting N- and P/Q-type Ca²⁺ channels. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 4330-4342.

Zoghbi, H.Y. (2003). Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science* 302: 826-830.