

Summary

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

Zusammenfassung

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