

Abstract

Inhibitory transmission in the central nervous system depends on the strength and plasticity of synaptic contacts, balancing the activity of neuronal excitation. Gephyrin, the principal scaffolding protein at inhibitory synapses, is essential for postsynaptic clustering of glycine (GlyRs) and GABA type A receptors (GABA_ARs). Synaptic localization and clustering of gephyrin, determining the strength of inhibitory transmission, are highly dynamic processes that are regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications.

This study aims to characterize and identify the function of the gephyrin-dynein light chain (DLC) interaction at synaptic sites. DLC is an integral part of the dynein motor and provides two identical binding sites that interact with gephyrin. Originally, DLC was believed as a gephyrin-cargo-adaptor, linking gephyrin-GlyR complexes to the dynein motor and driving their retrograde transport. However, gephyrin variants impaired in DLC-binding showed diminished postsynaptic clustering in primary hippocampal neurons, highlighting the essential role of DLC at the inhibitory postsynapse. Similarly, knockdown of DLC decreased the size and quantity of postsynaptic gephyrin clusters, whereas expression of DLC increased the amount of postsynaptic gephyrin. In contrast, expression of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS), the main source of NO in the brain, decreased the size of postsynaptic gephyrin clusters in hippocampal neurons. Normalized postsynaptic gephyrin clustering upon DLC and nNOS co-expression and the formation of a ternary complex together with gephyrin suggest a collective regulation of gephyrin cluster formation. Together, these findings reveal the molecular mechanism of DLC-mediated gephyrin clustering by regulating nNOS-dependent gephyrin S-nitrosylation at the inhibitory postsynapse.

Gephyrin is crucial for the excitation-inhibition balance and higher brain functions as evidenced by neurological disorders and epilepsy in patients with gephyrin mutations. Therefore, another aspect of this thesis was the characterization of a gephyrin missense mutation, identified in a patient with early onset epilepsy. This gephyrin missense mutation neither altered the structural integrity nor gephyrin scaffolding but decreased gephyrin sensitivity for proteolytic cleavage, causing aberrant gephyrin accumulations. These results suggest an altered gephyrin homeostasis that leads to an irregular excitation-inhibition balance and the pathologic phenotype of the patient.

Zusammenfassung

Inhibitorische Signalweiterleitung im zentralen Nervensystem steht in Abhängigkeit zur Stärke und Plastizität synaptischer Kontakte, welche die Aktivität neuronaler Erregbarkeit ausgleicht. Gephyrin stellt das wichtigste Gerüstprotein inhibitorischer Synapsen dar und ist essentiell für die Verankerung von Glycin (GlyR) and GABA Typ A Rezeptoren (GABA_AR). Synaptische Lokalisation und Clusterung von Gephyrin, welche nicht zuletzt die Stärke inhibitorischer Signalweiterleitung bestimmen, sind hoch dynamische Prozesse die durch Protein-Protein Interaktionen und posttranslationale Modifikationen reguliert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung und Identifikation der Funktion der Gephyrin-Dynein Light Chain (DLC) Interaktion an Synapsen. DLC ist ein integraler Bestandteil des Dynein Motors und birgt zwei identische Bindestellen, welche mit Gephyrin interagieren. Ursprünglich wurde DLC als Gephyrin-Cargo-Adapter betrachtet, der die Verbindung von Gephyrin-GlyR Komplexen zum Dynein Motor herstellt und den retrograden Transport antreibt. Gephyrin Varianten, welche in ihrer DLC-Bindung beeinträchtigt sind, zeigten allerdings ein verringertes postsynaptisches Clustern in primären hippocampalen Neuronen und verdeutlichten die essentielle Rolle von DLC an der inhibitorischen Postsynapse. Der Knockdown von DLC führte ebenfalls zu einer verringerten Größe und Anzahl postsynaptischem Gephyrins, wobei eine Überexpression von DLC die Menge an synaptischem Gephyrin erhöhte. Die Expression der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), der primären NO-Quelle im Gehirn, führte im Gegensatz dazu, zu einer Verkleinerung der Gephyrin Cluster in hippocampalen Neuronen. Die Normalisierung der Gephyrin Clusterbildung nach Co-Expression von DLC und nNOS und die Bildung eines ternären Komplexes zusammen mit Gephyrin, deuten auf eine wechselseitige Regulation der Bildung von Gephyrin Clustern hin. Zusammengefasst konnten diese Ergebnisse den molekularen Mechanismus der DLC-vermittelten Gephyrin-Clusterung durch die Regulation der nNOS abhängigen Gephyrin S-Nitrosylierung an der inhibitorischen Postsynapse aufzeigen.

Gephyrin ist entscheidend für das excitatorisch-inhibitorische Gleichgewicht und höhere Hirnfunktionen, welches durch neurologischen Erkrankungen und Epilepsie in Patienten mit Gephyrin Mutation verdeutlicht wird. Ein weiterer Teil dieser Arbeit war deshalb die Charakterisierung einer Gephyrin Missense-Mutation, welche in einem Patienten mit früh auftretender Epilepsie identifiziert wurde. Diese Gephyrin Missense-Mutation beeinflusste weder die strukturelle Integrität noch die Gephyrin Clusterung, verringerte jedoch die Sensitivität für einen proteolytischen Abbau, was zu einer aberranten Akkumulation von Gephyrin führte. Diese Ergebnisse deuten auf eine gestörte Gephyrin Homöostase hin, welche zu einem veränderten excitatorisch-inhibitorischen Gleichgewicht und dem pathologischen Phänotypen des Patienten führen.