

Zusammenfassung

Gephyrin ist das zentrale Gerüstprotein der inhibitorischen Synapse und verankert dabei die inhibitorischen Glycin-Rezeptoren (GlyR) und eine Vielzahl von γ -Aminobuttersäure Typ A Rezeptoren (GABA_ARs) in der postsynaptischen Membran. Von drei Domänen sind die Kristallstrukturen der konservierten trimeren N-terminalen G- und dimeren C-terminalen E-Domänen bekannt. Darauf basierend wurde ein hexagonales Netzwerk von Gephyrin unterhalb der postsynaptischen Membran postuliert, jedoch fehlen hierfür noch kritische experimentelle Evidenzen, da in *E. coli* exprimiertes Gephyrin ausschließlich Trimere in Lösung bildet. Zusätzlich werden Gewebe- und Spezies-spezifisch durch alternatives Spleißen eine Vielzahl von Gephyrin-Isoformen produziert. Bis heute sind der Einfluss des alternativen Spleißens und die molekulare Grundlage der synaptischen Gephyrin-Oligomerisierung unzureichend verstanden.

In dieser Arbeit wurde ein eukaryotisches Expressionssystem für drei verschiedene Gephyrin-Spleiß-Varianten (Geph, Geph-C3, Geph-C4) in Sf9 Insektenzellen etabliert und die Faltung, Oligomerisierung, Rezeptorbindung und posttranslationale Modifikationen untersucht. Im Vergleich zum *Escherichia coli* exprimiertem trimeren Gephyrin konnten für die Sf9-Gephyrin-Spleiß-Varianten Hexamere als kleinste funktionelle Einheit identifiziert werden. Zusätzlich wurden für Geph und Geph-C4 höher-oligomere Formen (~ 900 kDa) gefunden. Zwei voneinander unabhängige Experimente, die partielle Proteolyse und die Differenz-Scanning-Kalorimetrie, konnten eine kompakte Faltung der Gephyrin G-Domäne im Komplex mit der Gephyrin C-Domäne aufdecken. Dagegen zeigte die E-Domäne eine deutlich niedrigere Stabilität. Infolge der GlyR β -loop Bindung wurde für die E-Domänen der Geph und Geph-C4 Varianten eine signifikante Zunahme der Stabilität nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte die E-Domäne in Geph-C3 eine deutlich niedrigere Stabilität und eine in der Isothermalen Titrationskalorimetrie ermittelte um zwei Größenordnungen schwächere Bindung des GlyR β -loops. Anhand dieser Ergebnisse wurden zwei Modelle für die Domänenanordnung im hexameren Gephyrin entwickelt, welche entweder auf der Oligomerisierung der E- oder der C-Domänen beruhen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden posttranslationale Modifikationen in Sf9 Gephyrin identifiziert und ihr funktioneller Beitrag auf die Gephyrin-Clusterung untersucht. Es konnten insgesamt 18 neue Phosphorylierungsstellen in Gephyrin identifiziert werden, die alle -mit Ausnahme einer- in der C-Domäne lokalisieren. Mittels einer bioinformatischen Sequenzanalyse wurden verschiedene Kinase-Konsensusmotive für alle identifizierten Phosphorylierungsstellen gefunden. Die Suche nach entsprechenden Kinasen erfolgte mittels *in vitro* Phosphorylierung und subzellulärer Lokalisierung in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit entsprechenden Kinaseinhibitoren. Neben der bereits bekannten GSK3 β Kinase wurden Casein kinase II und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Erk als potentielle Kinasen für die Regulation der Gephyrin-Clusterung entdeckt. Die Mutagenese unterschiedlicher Phosphorylierungsstellen führte zu der Identifikation einer neuen Phosphorylierungsstelle (T324) in der Gephyrin E-Domäne, die die Oligomerisierung und Clusterung sowohl in nicht-neuronalen Zellen als auch in hippocampalen Neuronen beeinflusst. Während die phosphorylierungs-mimetische Variante Geph-C4 T324D ein verändertes Oligomerisierungsverhalten nach Expression in Sf9 Insektenzellen aufwies, zeigte die phosphorylierungs-defiziente Variante Geph-C4 T324A große elongierte Aggregate (*s.g. spikes*), die über die Bindung zweier Gephyrin-Liganden innerhalb oder in unmittelbarer Nähe des T324 beinhaltenden Motivs aufgelöst wurden. Darüber hinaus konnte durch die Expression beider Varianten in Neuronen eine veränderte synaptische Dichte und Größe beobachtet werden. Zusammengefasst, scheint das T324 einen entscheidenden Einfluss auf die Oligomerisierung und Clusterung von Gephyrin zu haben, was auf eine unbekannte Stelle für die Gephyrin Multimerisierung und Rezeptor-Clusterung hindeuten könnte.