

**Charakterisierung der Interaktion von
Gephyrin mit verschiedenen Untereinheiten
des GABA_A-Rezeptors**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sarah Katrin Kowalczyk
aus Duisburg
2012

Berichtersteller:

Prof. Dr. Günter Schwarz

Prof. Dr. Peter Kloppenburg

Tag der mündlichen Prüfung:

09.10.2012

Abstract

γ -aminobutyric acid type A receptors (GABA_ARs) are the main inhibitory ligand-gated ion channels in the central nervous system of vertebrates. To ensure efficient signal transduction, their localization and clustering at postsynaptic sites is essential. In contrast to the glycine receptor (GlyR), which is stabilized at synapses via the scaffolding protein gephyrin, much less is known about the mechanisms underlying the clustering of the complex family of GABA_ARs which assemble into pentamers out of 19 different subunits.

Immunohistochemical studies of different brain regions of wild type and knock-out mice suggested a gephyrin-dependent clustering mechanism for a subset of GABA_ARs. Recent studies, which have shown a direct interaction between gephyrin and the α 1-3 subunits of the GABA_AR, support this hypothesis.

In this work, further interactions between gephyrin and GABA_AR subunits β 2, β 3 and γ 2 have been identified by cosedimentation. These experiments revealed a common binding site for the GlyR β and GABA_AR α subunits located within the gephyrin E-domain. The lack of binding of the GABA_AR β 2 and β 3 loops to gephyrin variant P713E as well as sequence analysis identified a conserved isoleucine or valine in gephyrin-interacting receptor subunits leading to the hypothesis that there is a shared binding mechanism which is based on similar hydrophobic interactions between the receptor loops and gephyrin.

Binding between gephyrin and the GABA_AR β 2 subunit depends on a C-terminal motif within the intracellular loop and surface plasmon resonance measurements showed that it is one order of magnitude lower ($K_D = 9,7 \mu\text{M}$) than it was shown for the GlyR β loop. Analytical gel filtration underlined these findings and suggested a rapidly dissociating complex between the GABA_AR β 2 loop and gephyrin. This is comparable with data reported for the interaction of GABA_AR α 1 and α 3 subunits with gephyrin as well for receptor interactions with their scaffolding proteins at excitatory synapses. The binding sequence within the GABA_AR β 2 loop overlaps with an atypical interaction motif for the AP2-complex which is necessary for receptor endocytosis. Based on a specific phosphorylation site in that motif (serine 410), which blocks internalization a reciprocal mechanism for the regulation of internalization and clustering of β 2 subunit containing GABA_ARs is proposed, given that in this study an increased binding of gephyrin to a phosphorylated β 2 loop-variant was found.

The γ 2 subunit showed a phosphorylation-dependent binding to gephyrin as well. Binding to the unmodified variant was only possible for the longer splice variant (γ 2L) which identifies the additionally spliced eight amino acids in this isoform as minimal gephyrin binding motif. Phosphorylation of serine 327 increases the binding affinity and enables the short splice variant (γ 2S) to bind Gephyrin as well. Together with already published data it can be assumed that γ 2 phosphorylation regulates the equilibrium between clustering and lateral diffusion of receptors based on a NMDA-receptor induced phosphatase activity.

Zusammenfassung

Die γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren Typ A (GABA_ARs) sind die wesentlichen inhibitorischen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle im zentralen Nervensystem von Vertebraten. Für eine effiziente Signalweiterleitung ist ihre Lokalisation und Verankerung in der postsynaptischen Membran unverzichtbar. Im Gegensatz zum weniger komplexen Glycin-Rezeptor (GlyR), der über das zentrale Gerüstprotein Gephyrin an der Synapse stabilisiert wird, ist die Clusterung von $\text{GABA}_A\text{-Rs}$ weitaus komplexer und weniger gut verstanden.

Immunhistochemische Färbungen verschiedener Hirnregionen aus Wildtyp- und *knock-out*-Mäusen lassen ebenfalls eine Gephyrin-abhängige $\text{GABA}_A\text{-R}$ -Clusterung vermuten. Der Nachweis einer direkten Interaktion von Gephyrin mit den $\text{GABA}_A\text{-R}$ -Untereinheiten $\alpha 1\text{-}3$ stützt diese Hypothese.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine weitere direkte Bindung von Gephyrin an die $\text{GABA}_A\text{-R}$ -Untereinheiten $\beta 2$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ mittels Kosedimentationsanalysen gefunden werden, wobei die β -Untereinheiten – genau wie die α -Untereinheiten sowie der GlyR- β -Loop – an das gleiche Motiv innerhalb der Gephyrin-E-Domäne binden. Der Verlust der Bindung der Gephyrin-Variante P713E an $\text{GABA}_A\text{-R}$ - $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Loops sowie Sequenzanalysen, die ein konserviertes Isoleucin bzw. Valin in allen Gephyrin-interagierenden $\text{GABA}_A\text{-R}$ -Untereinheiten aufzeigen, lassen eine vergleichbare hydrophobe Wechselwirkung für alle Rezeptor-Bindungspartner vermuten.

Die Bindung des Gephyrins an den $\beta 2$ -Loop erfolgt über dessen C-Terminus, wobei diese Interaktion in Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messungen eine 10-fach schwächere Affinität zu Gephyrin aufwies ($K_D = 9,7 \mu\text{M}$) als der GlyR- β -Loop. Auch die analytische Gelfiltration ließ auf einen im Vergleich zum GlyR- β -Loop wesentlich instabileren Komplex zwischen Gephyrin und dem $\text{GABA}_A\text{-R}$ - $\beta 2$ -Loop schließen. Dies ist vergleichbar mit der Gephyrin- $\text{GABA}_A\text{-R}$ - $\alpha 1/3$ - sowie Rezeptor-Gerüstprotein-Interaktion an exzitatorischen Synapsen. Die Bindestelle im $\text{GABA}_A\text{-R}$ - $\beta 2$ -Loop überlappt mit einem atypischen Bindungsmotiv für den an der Endocytose beteiligten AP2-Komplex. Basierend auf einer Phosphorylierung in diesem Motiv (Serin 410), was zu einer reduzierten Internalisierung führt, wurde ein wechselseitiger Mechanismus zur Regulation der Clusterung und Internalisierung der Rezeptoren auf Grundlage der $\beta 2$ -Untereinheit postuliert und durch eine verstärkte Bindung von Gephyrin an die phosphorylierte $\beta 2$ -Untereinheit unterstützt.

Für die $\gamma 2$ -Untereinheit konnte ebenfalls eine phosphorylierungs-abhängige Bindung an Gephyrin gezeigt werden. Im unmodifizierten Zustand ist nur eine Bindung an die lange Spleiß-Variante ($\gamma 2\text{L}$) nachweisbar, was die zusätzlichen alternativ gespleißten acht Aminosäuren als minimale Gephyrin-Bindungssequenz identifiziert. Die Phosphorylierung des Serins 327 verstärkt die Interaktion mit Gephyrin deutlich und befähigt auch die kurze Spleiß-Variante ($\gamma 2\text{S}$) Gephyrin zu binden. Im Einklang mit veröffentlichten Daten erlauben die Daten dieser Arbeit einen Mechanismus zur Regulation des Equilibriums zwischen Clusterung und lateraler Diffusion aufgrund von einer NMDA-Rezeptor-induzierten Phosphatase-Aktivität zu postulieren.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Funktion von Synapsen im zentralen Nervensystem	1
1.1.1	Reizweiterleitung vermittelt durch Neurone und Gliazellen	1
1.1.2	Die inhibitorische Synapse	2
1.2	Aufbau und Funktion von Cys-Loop-Liganden-gesteuerten Ionenkanälen	4
1.2.1	Struktur und Funktion von Glycin-Rezeptoren	5
1.2.2	GABA _A -Rezeptoren	7
1.2.2.1	Struktur und Funktion von GABA _A -Rezeptoren	7
1.2.2.2	Posttranslationale Modifikation von GABA _A -Rezeptoren	9
1.3	Plastizität GABAerger Synapsen	10
1.3.1	Exo- und Endocytose von inhibitorischen GABA _A -Rezeptoren	10
1.3.2	Homöostatische Plastizität GABAerger Synapsen	13
1.4	Das postsynaptische Strukturprotein Gephyrin	14
1.4.1	Funktion und Struktur von Gephyrin	14
1.4.2	Posttranslationale Modifikationen von Gephyrin	17
1.4.3	Gephyrin-Interaktionspartner	18
1.4.4	Gephyrin-Interaktion mit dem Glycin-Rezeptor	20
1.4.5	Gephyrin-Interaktion mit dem GABA _A -Rezeptor	22
1.5	Ziele der Arbeit	24
2.1	Ergebnisse	26
2.1	Expression und Reinigung verschiedener Gephyrin-Varianten	26
2.2	Charakterisierung der direkten Interaktion zwischen Gephyrin und der GABA _A R-β2-Untereinheit	28
2.2.1	Erzeugung und Expression GST-fusionierter GABA _A R-Loops	28
2.2.2	Kosedimentation von Gephyrin mit GST-fusionierten GABA _A R-Loop-Konstrukten	29
2.2.3	Kosedimentation von Gephyrin-Spleiß-Varianten mit GST-fusioniertem GABA _A R-β2-Loop	31
2.2.4	Eingrenzung der Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA _A R-β2-Loop	32
2.2.5	Überprüfung der phosphorylierungs-abhängigen Bindung von Gephyrin an den GABA _A R-β2-Loop	36
2.2.5.1	Kosedimentation von Gephyrin mit einer phosphomimetischen GABA _A R-β2-Loop-Variante	36

2.2.5.2	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsanalyse	37
2.2.6	Vergleich der Gephyrin-Interaktion zwischen dem GABA _A R-β2- und -β3-Loop	39
2.2.7	Reinigung des GABA _A R-β2-Loops	40
2.2.7.1	Reinigung GST-fusionierter GABA _A R-β2-Loops	40
2.2.7.2	Reinigung isolierter GABA _A R-β2-Loops	41
2.2.8	Analyse der Bindungsstöchiometrie zwischen Gephyrin und verschiedenen GABA _A R-β2-Loop-Varianten	43
2.2.9	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	47
2.2.9.1	DLS-Messungen mit gereinigten Rezeptor-Loops	47
2.2.9.2	DLS-Messungen mit gereinigtem Gephyrin	50
2.2.10	Isothermale-Titrations-Kalorimetrie (ITC)	51
2.2.11	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR)	54
2.2.11.1	SPR-Messungen mit kovalent gekoppeltem Gephyrin	54
2.2.11.2	SPR-Messungen mit biotinyliertem GABA _A R-β2 ₃₉₀₋₄₂₀ -Peptid	56
2.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen der GABA _A R-γ2-Untereinheit und Gephyrin	57
2.3.1	Kosedimentation von Gephyrin mit GST-fusionierten GABA _A R-γ2-Loops	58
2.3.2	Kosedimentation von Gephyrin mit phosphomimetischen GABA _A R-γ2-Loops	59
2.4	Lokalisationsstudien mit verschiedenen fluoreszenz-markierten GABA _A R-Loops	60
3	Diskussion	64
3.1	Charakterisierung der direkten Interaktion zwischen der GABA _A R-β2-Untereinheit und Gephyrin	64
3.1.1	Direkte Gephyrin-Bindung von GABA _A R-β2 und -β3 über die GlyR-β-Bindetasche	65
3.1.2	Identifizierung der Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA _A R-β2-Loop	71
3.1.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen der GABA _A R-β2-Untereinheit und Gephyrin	80
3.2	Charakterisierung der direkten Interaktion zwischen der GABA _A R-γ2-Untereinheit und Gephyrin	84
3.3	Loop-Loop-Interaktionen innerhalb eines funktionellen Rezeptor-Pentamers	89
3.4	Potentielle Modulation von GABA _A Rs an inhibitorischen Synapsen in Abhängigkeit von Gephyrin	90
3.5	Ausblick	94

4	Material und Methoden	96
4.1	Materialien	96
4.1.1	Enzyme und Chemikalien	96
4.1.2	Organismen und Stämme	96
4.1.3	Plasmide	97
4.2	Molekularbiologische Methoden	97
4.2.1	Klonierungstechniken	97
4.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	97
4.2.3	Mutagenese-PCR	98
4.2.4	Restriktionsverdau und Ligation von PCR-Amplifikaten	98
4.3	Biochemische Methoden	99
4.3.1	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	99
4.3.2	Reinigung rekombinanter Proteine	100
4.3.3	Affinitätsreinigung 6-fach Histidin-markierter Proteine	100
4.3.4	Affinitätsreinigung GST-fusionierter Proteine	101
4.3.5	Größenausschlusschromatographie	102
4.3.6	Anionenaustauschchromatographie	102
4.3.7	Konzentrierung von Proteinlösungen	103
4.3.8	Umpufferung mittels Gelfiltration	103
4.3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	103
4.3.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	103
4.3.11	Western Blot-Analyse von Proteinen	104
4.3.12	Herstellung von Organ-Rohextrakten	105
4.4	Analytische Methoden	106
4.4.1	Kosedimentations-Analyse mit GST-fusionierten Proteinen	106
4.4.2	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsstudien	107
4.4.3	Analytische Gelfiltrationsläufe	107
4.4.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	108
4.4.5	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	108
4.4.6	Oberflächen Plasmon Resonanz Spektroskopie (SPR)	109
4.5	Zellbiologische Methoden	110
4.5.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	110
4.5.2	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	110
4.5.3	Herstellung mikroskopischer Präparate und Mikroskopie von HEK293-Zellen	111
4.5.4	Ernte und Aufschluss transfizierter HEK293-Zellen	111

5	Anhang	113
5.1	Primer	113
5.2	Konstrukte	115
5.3	Sequenzen	118
5.3.1	Gephyrinsequenz	118
5.3.2	Sequenzen der GABA _A R-Untereinheiten	119
5.4	Original SPR-Kurven	121
6	Literaturverzeichnis	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung einer Nervenzelle.	1
Abbildung 1.2:	Struktur der Cys-Loop-Liganden-gesteuerten Ionenkanäle.	4
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung eines Glycin-Rezeptor Pentamers mit den entsprechenden Bindestellen für Glycin und Strychnin.	6
Abbildung 1.4:	Schematische Struktur eines GABA _A R-Pentamers.	7
Abbildung 1.5:	Synthese und Transport von GABA _A -Rezeptoren.	11
Abbildung 1.6:	Aufbau der homologen Proteine Gephyrin, Cnx1, MogA und MoeA sowie die Kristallstruktur der Gephyrin E- und G-Domäne.	15
Abbildung 1.7:	Schematische Übersicht der verschiedenen Gephyrin-Spleiß-Varianten innerhalb der einzelnen Domänen.	16
Abbildung 1.8:	Kristallstruktur der Gephyrin E-Domäne mit gebundenem GlyR- β -Loop sowie Gephyrin-Bindestellen auf dem GlyR- β - und den GABA _A R- α 1-3-Loops.	21
Abbildung 1.9:	Schematische Darstellung einer GABAergen Synapse mit allen prä-/post- und extrasynaptischen Proteinen.	24
Abbildung 2.1:	Aufreinigung von rekombinant in <i>E. coli</i> exprimierten Gephyrin rC4c-Varianten.	27
Abbildung 2.2:	Kosedimentation von Gephyrin mit GST-fusionierten GABA _A R-Loops.	31
Abbildung 2.3:	Kosedimentation verschiedener Gephyrin-Spleiß-Varianten mit GST-fusionierten GABA _A R- β 2-Loops.	32
Abbildung 2.4:	Identifizierung der Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA _A R- β 2-Loop.	35
Abbildung 2.5:	Untersuchung eines möglichen Einflusses von phosphoryliertem Serin 410 auf die Gephyrin-GABA _A R- β 2-Loop Interaktion.	37
Abbildung 2.6:	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von GABA _A R- β 2-Loop-Varianten mit ATP und Hirn-Rohextrakt.	38
Abbildung 2.7:	Vergleich der Gephyrin-Interaktion mit dem GABA _A R- β 2 ₃₉₀₋₄₀₈ - und - β 3 ₃₈₉₋₄₀₇ -Loop.	40
Abbildung 2.8:	Aufreinigung von in <i>E. coli</i> rekombinant exprimiertem GST-GABA _A R- β 2 ₃₉₀₋₄₂₀ -Loop.	41
Abbildung 2.9:	Aufreinigung des isolierten GABA _A R- β 2 ₃₉₀₋₄₂₀ -Loops.	42
Abbildung 2.10:	Analytische Gelfiltration mit gereinigtem Gephyrin und GST-fusionierten sowie isolierten GABA _A R- β 2-Loops.	44
Abbildung 2.11:	Untersuchung der Homogenität und des Oligomerisierungsstatus verschiedener Proteinlösungen mittels dynamischer Lichtstreuung.	49

Abbildung 2.12: Untersuchung der Homogenität und des Oligomerisierungsstatus von Gephyrin in Abhängigkeit des Reinigungsgrades mittels dynamischer Lichtstreuung.	50
Abbildung 2.13: Isothermale-Titrations-Kalorimetrie mit verschiedenen GABA _A R-β2-Loop-Varianten.	53
Abbildung 2.14: Charakterisierung der Interaktion zwischen den Loops der GABA _A R-β2- bzw. GlyR-β-Untereinheit und Gephyrin mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.	55
Abbildung 2.15: Charakterisierung der Interaktion zwischen einem biotinylierten GABA _A R-β ₂₃₉₀₋₄₂₀ -Peptid und Gephyrin mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.	57
Abbildung 2.16: Kosedimentation von Gephyrin mit GST-fusioniertem GABA _A R-γ2L- und -γ2S-Loop.	58
Abbildung 2.17: Phosphorylierungs-abhängige Interaktion von GABA _A R-γ2-Untereinheiten mit Gephyrin.	59
Abbildung 2.18: Subzelluläre Lokalisation verschiedener GABA _A R-Loops.	62
Abbildung 3.1: Strukturvorhersage für die intrazellulären Loops der GlyR-β- sowie GABA _A R-β2/3/α1/2/3-Untereinheiten.	67
Abbildung 3.2: Alignment der Gephyrinbindestellen innerhalb der GlyR-β-, GABA _A R-α1-3- und -β2/3-Untereinheit.	69
Abbildung 3.3: Alignment von GABA _A R-β2-Untereinheiten aus verschiedenen Organismen.	72
Abbildung 3.4: Hypothese zur Phosphorylierungs-abhängigen Regulation der Clusterung und Internalisierung von GABA _A R-β2-Untereinheiten.	75
Abbildung 3.5: Alignment der GABA _A R-β1-3 cytoplasmatischen Loops zwischen den Transmembrandomänen drei und vier.	77
Abbildung 3.6: Hypothese zur Regulation der Clusterung und lateralen Mobilität von GABA _A Rs durch NMDA-Rezeptoren.	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen GABA _A R-Loops aus <i>M. musculus</i> im pGEX-6P-1-Vektor	29
Tabelle 2.2: Aminosäuresequenzen der trunkierten GABAAR-β2-Loops zur Eingrenzung des Gephyrin-Bindemotivs	33
Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Organismen und Stämme	96
Tabelle 4.2: Übersicht der verwendeten Plasmide	97
Tabelle 4.3: Expressionsbedingungen verschiedener bakterieller Expressionskonstrukte	99
Tabelle 4.4: Für Western-Blot-Analysen verwendete Antikörper	105
Tabelle 4.5: Angaben zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen	111
Tabelle 5.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer	113
Tabelle 5.2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte	115

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIS	Axoninitialsegment
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
AMPAR	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptor
AP2	Clathrin-Adapterprotein 2
BCIP	5-Brom-4-Chlor-indolylphosphat
BIG2	Brefeldin A-inhibierte GDP/ GTP Austauschfaktor 2
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Kinase
CB	Collybistin
CDK5	Cyclin-abhängige Kinase 5
DLC	<i>dynein light chain</i> (Dynein leichte Kette)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ECD	Extrazelluläre Domäne
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
Erk	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Rinerserum)
g, mg, μ g, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
G	freie Energie
GABA	<i>γ-amino butyric acid</i> (γ -Aminobuttersäure)
GABA _A R	<i>γ-amino butyric acid type A receptor</i> (γ -Aminobuttersäure Typ A Rezeptor)

GABARAP	GABA _A R-assoziiertes Protein
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GEF	<i>guanin exchange factor</i> (Nukleotidaustauschfaktor)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grünes fluoreszierendes Protein)
GluR	Glutamat-Rezeptor
GlyR	Glycin-Rezeptor
GODZ	Golgi-spezifische DHHC-Zink-Finger-Protein
GSK3 β	Glycogen-Synthase-Kinase 3 β
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H	Enthalpie
HAP1	Huntingtin-assoziierten Proteins 1
HEK293	<i>human embryonic kidney (cell)</i> (humane embryonale Nierenzellen)
His-tag	Histidin-tag
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>horeseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> (Isothermale-Titrations-Kalorimetrie)
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	KiloDalton
KIF 5	Motorproteine der Kinesin-Superfamilie 5
LB	Luria-Bertani
LGIC	Liganden-gesteuerter Ionenkanal
μ M	Mikromolar
M	Mol
MAGUK	Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen
Mena/VASP	<i>mammalian enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein family</i>
N	Stöchiometrie
n	Anzahl der Messungen
min	Minute
Moco	Molybdän-Cofaktor

ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht
nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
Ni-NTA	Ni-Nitrilotriessigsäure
NL2	Neuroigin 2
NLS	<i>nuclear localization signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
nm	Nanometer
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDZ	<i>PSD Protein, Discs Large, Zonula Occludens-1-Domäne</i>
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyd
Pin1	Peptidyl-Prolyl Isomerase NIMA interagierendes Protein 1
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLIC-1	<i>protein that links integrin-associated protein with the cytoskeleton-1</i>
PP1 α /PP2A	Protein Phosphatase 1 α / 2A
PRIP	Phospholipase-C-verwandten katalytisch inaktiven Proteine 1 und 2
PSD	postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RFP	rot fluoreszierendes Protein
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Entropie
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SPR	Oberflächen Plasmon Resonanz Spektroskopie
SV	Säulenvolumen

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
vGAT	<i>vesicular GABA transporter</i> (vesikulärer GABA-Transporter)
xg	vielfaches der Erdbeschleunigung
ZNS	zentrales Nervensystem

Abkürzungen für Artennamen

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>M. mulatta</i>	<i>Macaca mulatta</i>

1 Einleitung

1.1 Funktion von Synapsen im zentralen Nervensystem

1.1.1 Reizweiterleitung vermittelt durch Neurone und Gliazellen

Das menschliche Gehirn setzt sich aus Billionen von Nervenzellen (Neuronen), Gliazellen sowie weiteren Zelltypen zusammen, die in ihrer Gesamtheit zusammen mit dem Rückenmark ein komplexes informationsverarbeitendes Netzwerk, das zentrale Nervensystem (ZNS), bilden. Dieses ermöglicht komplexe Funktionen wie Speicherung und Integration von Informationen und bedarf hierfür einer effizienten Signalweiterleitung. Dabei leiten Neurone die Signale weiter und stellen somit die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems dar. Neurone bestehen aus einem Zellkörper, dem Soma, das den Zellkern und weitere Zellorganellen enthält sowie langen Fortsätzen für Signalempfang und -weiterleitung (Abb. 1.1). Leiten diese Signale zum Soma, handelt es sich um Dendriten, wohingegen das vom Soma meist einzeln abgehende Axon Signale zu anderen Neuronen übermittelt. Um ihre Effizienz und somit die Schnelligkeit der Signalweiterleitung zu erhöhen, sind die Axone mit speziellen Gliazellen umschlossen. Diese so genannten Schwann'schen Zellen bilden zusammen eine isolierende Hülle, die Myelinscheide, die durch die Ranvier'schen Schnürringe unterbrochen wird. Durch die Myelinscheide werden Signalverluste und die benötigte Energie minimiert und eine schnelle Signalweiterleitung wird ermöglicht. An

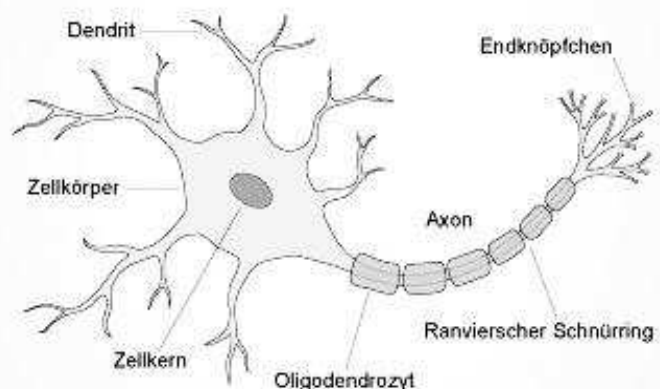


Abb.1.1: Schematische Darstellung einer Nervenzelle in bis zu tausende synaptische (Neurowissenschaftliche-Gesellschaft, 2012).

Endigungen, an denen die Übertragung ankommender Signale auf das folgende Neuron – je nach Synapsen-Typ – meist über chemische Botenstoffe wie γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin, Acetylcholin und Glutamat oder elektrische Signale vermittelt wird (Campbell, 2000). Ein ankommendes Aktionspotential, das eine Veränderung des Membranpotentials induziert, bewirkt eine Neurotransmitter-Ausschüttung in den durch Prä- und Postsynapse gebildeten synaptischen Spalt. Die Neurotransmitter binden an spezifische Liganden-gesteuerte Rezeptoren und bewirken je nach Rezeptortyp eine Depolarisation oder Hyperpolarisation

der postsynaptischen Membran. Wird ein Schwellenwert im Zellkörper überschritten, so kommt es zur erneuten Ausbildung eines Aktionspotentials am Axonhügel, das sich über die Dendriten und Axone des nachgeschalteten Neurons bis zur nächsten Synapse ausbreiten kann (Campbell, 2000).

Gliazellen sind dagegen nicht direkt an der Weiterleitung von Nervenimpulsen beteiligt, aber für die strukturelle Integrität und Funktionsfähigkeit von Neuronen unverzichtbar. Oligodendrocyten, eine von vielen Gliazellsubtypen, bilden beispielsweise das isolierende Myelin der Myelinscheide (Campbell, 2000). Astrocyten – welche die Mehrheit der Gliazellen im ZNS darstellen – versorgen dagegen die Nervenzellen mit Energie sowie Metaboliten, regulieren die Homöostase an der Synapse und können sogar einen direkten Einfluss auf die neuronale Signalübertragung haben (Eroglu und Barres, 2010; Fellin, 2009).

1.1.2 Die inhibitorische Synapse

Im Zentralnervensystem von Vertebraten sind zwei chemische Synapsen-Typen vertreten, deren Zusammenspiel die Grundlage für die Informationsweiterleitung bildet. Beide unterscheiden sich unter anderem in der biochemischen Zusammensetzung ihrer postsynaptischen Dichte (PSD) (Gray, 1969), die sich vor allem durch Gerüst-Proteine auszeichnet, die mit Neurotransmitter-Rezeptoren und Signalmolekülen assoziiert vorliegen.

Die exzitatorischen, asymmetrischen Synapsen zeichnen sich durch eine sehr komplexe postsynaptische Dichte aus, die zahlreiche PDZ (*PSD Protein, Discs Large, Zonula Occludens-1*)-Domänen enthaltende Gerüstproteine wie z.B. PSD-95 und andere Mitglieder der Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUKs) enthält (Collins et al., 2006). Die PDZ-Interaktionsmotive sind charakteristisch für viele Gerüst-Proteine, da sie die Ausbildung modularer Proteinkomplexe ermöglichen (Sheng und Sala, 2001). An diesem Synapsen-Typ sind vor allem Glutamat- (N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-)/ α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptor (AMPA)), aber auch Aspartat-Rezeptoren vertreten.

Im Vergleich dazu enthält die PSD von inhibitorischen, symmetrischen Synapsen eine weitaus geringere Anzahl an Proteinen. Ein Hauptbestandteil ist das Gerüst-bildende Protein Gephyrin (vgl. 1.4), ein Multidomänen-Protein ohne PDZ-Domänen, aber mit der Fähigkeit, Cluster zu bilden, denen ein postulierter Mechanismus der Autooligomerisierung vorliegt. Dadurch kann es ein Gerüst für postsynaptische Proteine wie GABA_A-Rezeptoren, Glycin-Rezeptoren, Neuroligin und Collybistin liefern und diese am Cytoskelett verankern (Fritschy et al., 2008; Kneussel und Betz, 2000). Eine weitere Stabilisierung postsynaptischer Proteine erfolgt über transsynaptische Protein-Protein-Interaktionen wie Neurexine/Neuroligine, Integrine, Ephrine und Cadherine (Fritschy et al., 2012) sowie den Dystrophin-Glykoprotein-

Komplex (DGC) (Knuesel et al., 1999; Haenggi und Fritschy, 2006) und Neuroplastin-65 (Sarto-Jackson et al., 2012). Bei diesen Kontakten handelt es sich jedoch nicht um starre Gebilde. An der Synapse liegt ein Equilibrium vor, in dem Rezeptoren innerhalb von Sekunden bis Minuten von verankernden Proteinen gebunden, aber auch abgegeben werden können, was zu einem schnellen Austausch zwischen synaptischen und extrasynaptischen Bereichen führt. Diese dynamischen Prozesse werden zusätzlich von der inhibitorischen und exzitatorischen Aktivität in Neuronen beeinflusst. Die gegenseitige Regulation von hemmender und erregender Aktivität wurde durch Beobachtungen bestätigt, die zeigen dass der Ca^{2+} -Einstrom durch NMDARs die GABAerge Transmission reduziert (Chen and Wong 1995, Wang and Stelzer 1996) sowie dass eine verstärkte Gephyrin-Clusterung eine reduzierte Anzahl an PSD-95 Clustern bewirkt (Lardi-Studler et al., 2007).

Die Rezeptoren werden am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, assembliert und über den Golgi-Apparat und vesikulären Transportweg zur Membran rekrutiert. Molekulare Motoren vermitteln diesen intrazellulären Transport (Hirokawa und Takemura, 2005). Dabei erfolgt der Langstrecken-Transport über Mikrotubuli, wohingegen Myosine entlang von Aktinfilamenten meist den finalen Schritt an der extrasynaptischen Plasmamembran – Übergabe oder Internalisierung – vermitteln (Bridgman, 2004). Da diese Prozesse aufgrund der starken dezentralen Lokalisation der Synapsen im Vergleich zum sehr kleinen Soma (ca. 1 % des neuronalen Zellvolumens) erstaunlich schnell ablaufen, konnte in jüngerer Zeit der lokalen Proteinsynthese in räumlicher Nähe von Synapsen eine besondere Bedeutung zugeschrieben werden (Cajigas et al., 2010). Endocytose schließt Clathrin- und Dynamin-abhängige Prozesse ein, woraufhin der Transport internalisierter Rezeptoren zum Endosom stattfindet. Von dort aus findet entweder ein Weitertransport zum Lysosom statt, was in der Degradation der Rezeptormoleküle resultiert, oder die Rezeptoren gelangen über das trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran, wo sie erneut inseriert werden (Michels und Moss, 2007).

GABA ist ein Glutamat-Derivat und wird ausschließlich von zwei Glutamat-Decarboxylasen (GAD67 und GAD65) im präsynaptischen Terminal synthetisiert (Soghomonian und Martin, 1998). Die Glycin-Synthese wird dagegen durch die Serin-Hydroxymethyltransferase in Mitochondrien vermittelt. Nach erfolgter Synthese werden beide Neurotransmitter durch den vesikulären inhibitorischen Aminosäure-Transporter (VIAAT) innerhalb des synaptischen Endknöpfchens in Vesikel verpackt (Dumoulin et al., 1999). Durch ein ankommendes Aktionspotential und die daraus resultierende Depolarisation der präsynaptischen Membran werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle geöffnet. Der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran und es kommt zur Freisetzung der Neurotransmitter in

den synaptischen Spalt, wo sie an spezifische Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (GABA_ARs und GlyRs) in der postsynaptischen Membran binden (Abb.1.5).

GABA_ARs und GlyRs können dabei auch gemeinsam an einer Synapse auftreten (Dumoulin et al., 2000). Die Chlorid-sensitiven Kanäle öffnen sich und es kommt in adulten Neuronen zur Hyperpolarisation und somit zur Herabsetzung der Erregbarkeit des postsynaptischen Neurons. Die im synaptischen Spalt befindlichen Neurotransmitter werden mittels Endocytose erneut in die Präsynapse oder benachbarte Gliazellen aufgenommen. Dieser Prozess beendet die synaptische Aktivität und limitiert die Öffnung der Rezeptorkanäle bzw. die resultierende Inhibition (Jensen et al., 2003).

1.2 Aufbau und Funktion von Cys-Loop-Liganden-gesteuerten Ionenkanälen

Die Cys-Loop-Rezeptoren sind eine wichtige Superfamilie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (LGICs) und umfassen Acetylcholin-, 5-HT₃- (5-Hydroxytryptamin Typ 3-), Glycin- und GABA (Typ A und C)-Rezeptoren (Connolly und Wafford, 2004). Diese unterscheiden sich vor allem bezüglich der Effektorstelle, der Ionenselektivität und daraus resultierend in der Antwort der nachfolgenden Nervenzelle. Es handelt sich um sehr effiziente Signalwege, die das Membranpotential innerhalb von Millisekunden ändern können, was sie wesentlich von *second messengern*, welche über G-Protein-gekoppelte Mechanismen agieren, unterscheidet (Strange, 1988).

Nach Ligandenbindung kommt es zur Öffnung und zum Ionenfluss zwischen externem und internem Milieu. Dieser basiert auf einem Konzentrationsgefälle und dem Selektivitätsfilter, der ausschließlich den Transport definierter Ionen erlaubt. Hierbei bewirken Kationen (Na⁺- und Ca²⁺-Ionen) einen depolarisierenden, exzitatorischen Effekt, während Anionen (Cl⁻-Ionen) zu einer Hyperpolarisation und somit

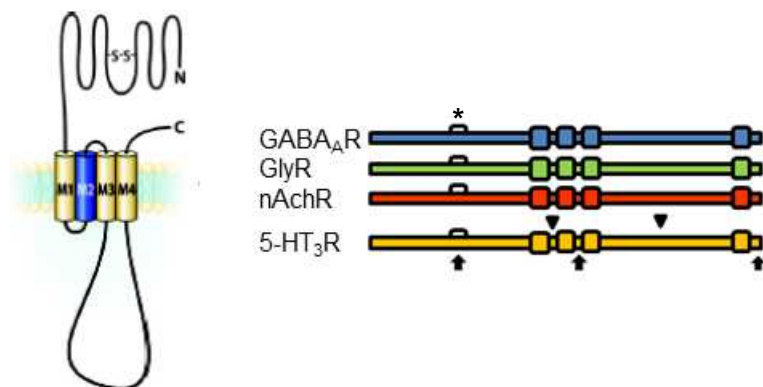


Abb.1.2: Struktur der Cys-Loop-Liganden-gesteuerten Ionenkanäle. Die Superfamilie umfasst GABA_{A/C}-, Glycin-, nAcetylcholin- und 5-HT₃-Rezeptoren. Sie setzen sich aus einer großen, N-terminalen extrazellulären Domäne mit dem Cys-Loop-Motiv (*), vier Transmembrandomänen sowie intra- (Dreieck) und extrazellulären (Pfeil) Loops zwischen den einzelnen Domänen zusammen. Der große intrazelluläre Loop zwischen den Transmembrandomänen drei und vier dient dabei der Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen (modifiziert nach Bennarroch 2007, Connolly und Wafford, 2004).

Inhibition führen. Kommt es zu Anomalitäten und Fehlfunktionen der LGICs oder assoziierter Proteine, so resultiert dies in Krankheiten die von Epilepsie über Angstzustände, Schizophrenie, Bewegungs- und Wahrnehmungsstörungen bis hin zu neuronalem Zelltod (Excitotoxizität) reichen (Connolly und Wafford, 2004).

Informationen bezüglich des Aufbaus und der Struktur von LGICs konnten aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Röntgenkristallanalysen des Acetylcholin-Bindeproteins (Brejc et al., 2001), des Acetylcholin-Rezeptors (Unwin, 2003, 2005) sowie eines prokaryotischen Liganden-gesteuerten Ionenkanals (Hilf und Dutzler, 2008) gewonnen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird für alle Mitglieder der Cys-Loop Superfamilie eine vergleichbare Zusammensetzung vermutet (Brejc et al., 2001). Jede der Untereinheiten setzt sich aus vier Transmembrandomänen (TM) zusammen, die durch intra- sowie extrazelluläre Loops miteinander verbunden sind (Abb. 1.2). Jeweils die zweite TM einer jeden Untereinheit bildet dabei die intrinsische Ionenpore im pentameren Rezeptor (Corringer et al., 2000).

Beide Termini des Rezeptors sind extrazellulär lokalisiert, wobei die große N-terminale Domäne (*extracellular domain*, ECD) etwa 50 % des gesamten Rezeptors ausmacht und der Ligandenbindung zwischen den Grenzflächen zweier benachbarter Untereinheiten dient (Corringer et al., 2000). Diese Domäne enthält auch das charakteristische, namensgebende und hoch konservierte Cys-Cys-Loop-Motiv. Dessen Disulfidbrücke kann aufgrund der extrazellulären, oxidierenden Bedingungen bestehen und trägt zur Stabilisierung der Tertiärstruktur bei (Mishina et al., 1985). Durch die Bindung eines Agonisten kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb der ECD und zur Verlagerung des Cys-Cys-Loops. Diese Änderungen werden zur kanalbildenden TM2 weiter gegeben und es kommt zur Öffnung der Pore, was die passive Diffusion spezifischer Ionen ermöglicht (Miyazawa et al., 2003).

Der verlängerte intrazelluläre Loop zwischen TM3 und TM4 dient der Interaktion mit zahlreichen cytoplasmatischen Proteinen und liefert die Hauptverbindung des Rezeptors mit der intrazellulären Umgebung. Dies ist vor allem ausschlaggebend für die Regulierung der synaptischen Lokalisation und den Transport der Rezeptoren (Connolly und Wafford, 2004).

Im weiteren Verlauf wird ausschließlich auf den Aufbau sowie die Funktion von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren eingegangen, da diese für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

1.2.1 Struktur und Funktion von Glycin-Rezeptoren

Glycin, die einfachste Aminosäure, ist der überwiegende inhibitorische Neurotransmitter im Rückenmark (Connolly und Wafford, 2004) und aktiviert die Strychnin-sensitiven Glycin-Rezeptoren. Des Weiteren sind GlyRs im Hirnstamm (Altschuler et al., 1986; Alvarez et al.,

1997), im Nukleus des auditorischen Systems (Friauf et al., 1997), der Retina (Vitanova et al., 2004), dem Vorderhirn sowie der Kleinhirnrinde (Leite und Cascio, 2001) vertreten. Aufgrund dieser spezifischen Lokalisation fungiert die glycinerge Transmission vor allem in der Verarbeitung von motorischen und sensorischen Informationen, die Bewegung, Sehvermögen und auch Hören (Frequenzunterscheidung) beeinflussen (Lopez-Corcuera et al., 2001).

GlyRs weisen eine geringe Diversität auf und setzen sich aus α - (48 kDa) und β -Untereinheiten (58 kDa) zusammen (Grudzinska et al., 2005)(Abb.1.3). Dabei treten ausschließlich bei der α -Untereinheit

verschiedene Isoformen (α 1-4) auf, die zusätzlich durch alternatives Spleißen (α 1 und α 2) in der extrazellulären Domäne sowie im cytoplasmatischen Loop modifiziert werden können (Leite und Cascio, 2001) und untereinander eine Sequenzhomologie von >80 % aufweisen (Betz und Laube, 2006). Ein funktionelles GlyR-Pentamer setzt sich

aus zwei α - und drei β -Untereinheiten zusammen, wobei eine Kombination aus α 1- und β -Untereinheiten das am häufigsten vorkommende Heteropentamer widerspiegelt (Grudzinska et al., 2005). Die α -Untereinheiten können auch funktionelle Homopentamere ausbilden (Sontheimer et al., 1989), die sich aber von Heteropentameren in ihrer Chloridleitfähigkeit unterscheiden (Bormann et al., 1993) und ausschließlich in Abwesenheit der β -Untereinheit auftreten. Letztere übt über ein Sequenz-Motiv innerhalb der extrazellulären Domäne einen dominant-negativen Effekt auf die Ausbildung von Homopentameren aus (Kuhse et al., 1993).

Neben dem physiologischen Agonisten Glycin sind auch Taurin und β -Alanin (Legendre, 2001) in der Lage, den Rezeptor zu aktivieren. Binden mehr als zwei Glycin-Moleküle zwischen einer α - und einer β -Untereinheit kommt, es zur Kanalöffnung. Eine Bindung des Alkaloids Strychnin – eines kompetitiven Antagonisten – führt dagegen zu einer reduzierten GlyR-vermittelten Inhibition, die in Krämpfen resultiert (Laube et al., 2000).

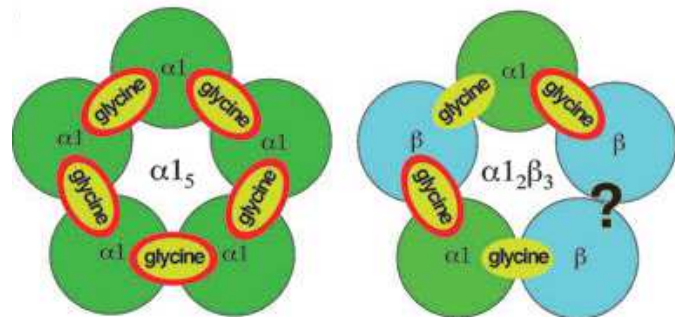


Abb.1.3: Schematische Darstellung eines Glycin-Rezeptor Pentamers mit den entsprechenden Bindestellen für Glycin und Strychnin. Dargestellt ist sowohl die Zusammensetzung eines Homopentamers (α 1₅) als auch eines Heteropentamers (α 1₂ β ₃). Glycin-Bindestellen sind gelb dargestellt, während Strychnin-Bindestellen eine rote Umrandung aufweisen. Über eine mögliche Bindestelle zwischen den beiden β -Untereinheiten im Heteropentamer ist bisher nichts bekannt (Betz und Laube 2006).

Nach der Assemblierung der GlyR-Pentamere im ER ist die N-Glykosylierung Voraussetzung für den Transport der funktionellen GlyRs zum Golgi-Apparat (Kuhse et al., 1993). Der Transport der Rezeptoren zur Plasmamembran sowie die Clusterung in postsynaptischen Bereichen wird über das Gerüstprotein Gephyrin vermittelt und später genauer betrachtet (vgl. 1.4.4).

1.2.2 GABA_A-Rezeptoren

1.2.2.1 Struktur und Funktion von GABA_A-Rezeptoren

Schnelle GABA-vermittelte inhibitorische Neurotransmission erfolgt durch die Aktivierung ionotroper GABA_A-Rezeptoren im Gehirn (Rudolph und Mohler, 2004) sowie GABA_C-Rezeptoren in der Retina (Bormann und Feigenspan, 1995). Langsame neuronale GABA-induzierte Aktivität erfolgt dagegen über metabotrope GABA_BRs, die zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen (Couve et al., 2000). Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt allerdings auf den GABA_A-Rezeptoren, weshalb ausschließlich diese im Detail beschrieben werden.

GABA_ARs kontrollieren im adulten Gehirn wichtige Aspekte der Entwicklung wie Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläufer, neuronale Migration und dendritische Reifung der Neurone (Luscher et al., 2011). Eine korrekte Entwicklung und Aktivitäts-abhängige Regulation der GABAergen Transmission ist somit für nahezu alle Aspekte der Funktion des ZNS essentiell. Dabei verändert sich die funktionelle Stärke GABAerger Synapsen in Abhängigkeit von der Anzahl postsynaptischer GABA_ARs (Nusser et al., 1997; Otis et al., 1994). Bereits eine geringe Reduktion (5-35 %) in GABA_A-defizienten Mäusen führt zu signifikanten Verhaltensänderungen (Crestani et al., 1999). Generelle Defizite in der GABAergen Signalweiterleitung resultieren in verschiedenen Krankheitsbildern wie Epilepsie (Fritschy, 2008), Angstneurosen (Lydiard, 2003), affektive Störungen (Craddock et al., 2010) und Schizophrenie (Charych et al., 2009).

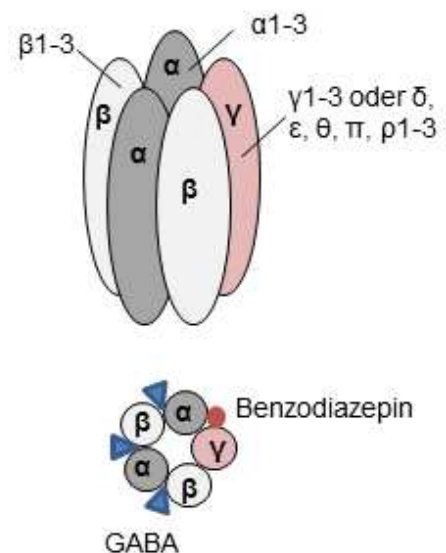


Abb.1.4: Schematische Struktur eines GABA_AR-Pentamers. Die Mehrheit der Pentamere setzt sich aus zwei α1-, zwei β2- und einer γ2-Untereinheit zusammen, wobei auch andere Kombinationen möglich sind. Die fünf Untereinheiten bilden zusammen den intrinsischen Ionenkanal, der nach GABA-Bindung zwischen der α- und β-Untereinheit durchlässig für Chlorid wird, was zu einem inhibitorischen, postsynaptischen Potential führt (modifiziert nach Benarroch 2007; Moss und Smart 2001).

Im Gegensatz zu GlyRs weisen GABA_ARs eine sehr hohe Diversität auf. Insgesamt 19 verschiedene für GABA_AR-Untereinheiten kodierende Gene sind bekannt, die basierend auf ihrer Sequenzhomologie in acht Unterklassen eingruppiert wurden: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π und ρ 1-3. Dabei weisen Mitglieder der verschiedenen Unterklassen eine Sequenzhomologie von 30-40 % auf, während diese bei Vertretern einer Unterklasse 60-80 % beträgt (Barnard et al., 1998). Die höchste Variabilität zwischen den Mitgliedern einer Unterklasse ist im großen, intrazellulären Loop zwischen TM3 und 4 zu finden (Olsen und Sieghart, 2008). Zudem erhöht alternatives Spleißen die Rezeptor-Diversität in zelltypspezifischer Weise. So liegen die γ 2- (Whiting et al., 1990) und β 2-Untereinheiten (McKinley et al., 1995) zusätzlich als kurze und lange Spleiß-Varianten vor. Die γ 2L-Variante dominiert allerdings im Laufe der Entwicklung über der γ 2S-Isoform (Burt und Kamatchi, 1991). Aus diesen verschiedenen Untereinheiten ergibt sich eine theoretisch sehr hohe Anzahl an unterschiedlichen Untereinheiten-Kombinationen innerhalb eines Pentamers. Allerdings wurden elf strukturell und funktionell verschiedene Rezeptor-Subtypen identifiziert, die in verschiedenen Bereichen des Gehirns vermehrt auftreten (Luscher et al., 2011; Rudolph und Mohler, 2004). Diese setzen sich aus Kombinationen von zwei α -, zwei β - und einer einzelnen γ 2- oder δ -Untereinheit zusammen. Weitere 15 Rezeptor-Subtypen mit einer geringeren Verteilung im Gehirn konnten ebenfalls klassifiziert werden (Olsen und Sieghart, 2008). Synaptisch lokalisierte GABA_ARs setzen sich aus zwei α 1-, α 2- oder α 3-Untereinheiten mit zwei β 2- oder β 3- und einer einzelnen γ 2-Untereinheit zusammen. Eine β -Untereinheit ist dabei für funktionelle GABA_ARs unverzichtbar (Wan et al., 1997), wobei β 2- und β 3-Untereinheiten ein nahezu komplementäres Verteilungsmuster aufweisen. Die β 2-Untereinheit koexprimiert überwiegend mit der α 1-, wohingegen die β 3-Untereinheit hauptsächlich mit der α 2- oder α 3-Untereinheit in Assoziation gefunden wurde (Fritschy und Mohler, 1995). Die mit 60 % am häufigsten vertretene Untereinheitenkomposition der GABA_ARs im Ratten-Gehirn ist α 1 β 2 γ 2 (Connolly et al., 1996; Fritschy und Mohler, 1995), wohingegen α 2 β 3 γ 2 mit 20-30 % eine weitere wichtige Kombination darstellt (Fritschy und Mohler, 1995). Diese Rezeptor-Subtypen weisen eine geringe Affinität für GABA auf und reagieren somit selektiv auf hohe GABA-Konzentration (300 μ M) im synaptischen Spalt (Perrais und Ropert, 1999), wobei es zu einer kurzen Öffnung des Ionenkanals (< 1 ms) und einer phasischen Inhibition kommt. Die Bindung des Neurotransmitters findet dabei zwischen den α - und β -Untereinheiten statt, so dass insgesamt drei GABA-Moleküle binden können (Abb.1.4).

Der Antagonist Benzodiazepin bindet dagegen zwischen einer α - und einer γ -Untereinheit (Abb.1.4) (Benarroch, 2007). Während bereits Pentamere aus $\alpha\beta$ -Untereinheiten funktionelle, Oberflächen-exponierte Rezeptoren darstellen und wahrscheinlich für tonische Inhibition verantwortlich sind (Brickley et al., 1999), ist die γ 2-

Untereinheit für eine synaptische Lokalisation sowie die Benzodiazepin-Sensitivität der Rezeptoren essentiell (Essrich et al., 1998).

Extrasynaptisch lokalisierte GABA_ARs vermitteln tonische Inhibition und sind vor allem durch $\alpha 4\beta\delta$ -Rezeptoren im Vorderhirn, $\alpha 6\beta\delta$ -Rezeptoren im Cerebellum und $\alpha 1\beta\delta$ -Rezeptoren in hippocampalen Interneuronen vertreten (Glykys und Mody, 2007). Diese Rezeptoren zeichnen sich durch eine hohe Agonist-Affinität im Bereich submicromolarer GABA-Konzentrationen außerhalb der Synapse aus (Ke et al., 2000; Saxena und Macdonald, 1996). Sie weisen längere Öffnungszeiten des Rezeptors auf und vermitteln somit dem Neuron eine konstant tonische Inhibition, was den Grenzwert für ein Aktionspotential erhöht (Farrant und Nusser, 2005).

Generell wird die synaptische bzw. extrasynaptische Lokalisation des Rezeptors nicht durch eine einzelne Untereinheit, sondern die Untereinheiten-Zusammensetzung bestimmt (Nawrotzki et al., 2012) und basiert auf dem Zusammenspiel der α - mit den γ - und δ -Untereinheiten (Wu et al., 2012).

1.2.2.2 Posttranslationale Modifikation von GABA_A-Rezeptoren

Neben der komplexen und mosaikalen Untereinheiten-Kombination und alternativem Spleißen kann die Funktion der GABA_A-Rezeptoren auch durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Palmitoylierung und Ubiquitinierung moduliert werden. Die Reversibilität einiger dieser Modifikationen ermöglichen eine schnelle und effiziente Regulation synaptischer Prozesse und ihrer Dynamik. Dadurch modulieren sie die generelle Funktion eines Proteins sowie dessen Interaktion mit anderen Proteinen und sind in Prozessen wie der synaptischen Stabilität und dem Transport involviert (Moss und Smart, 2001).

Mehrere Phosphorylierungs-Stellen konnten innerhalb des cytosolischen GABA_AR- $\gamma 2$ -Loops (S327, S343 – ausschließlich in $\gamma 2L$ –, S355, T357, Y365, Y367) und den GABA_AR- β -Untereinheiten ($\beta 1$: S409; $\beta 2$: S410; $\beta 3$: S383, S408, S409) identifiziert werden (zusammengefasst in Luscher et al., 2011). Dabei können die Reste S408/409 der $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Untereinheit sowohl von der Protein Kinase A (PKA) (McDonald et al., 1998) als auch der Protein-Kinase-C (PKC) (Brandon et al., 2000) phosphoryliert werden. S410 der $\beta 2$ -Untereinheit wird dagegen durch die PKC (Brandon et al., 2003; McDonald et al., 1998), CaMKII (McDonald und Moss, 1994) oder Akt-Kinase (Proteinkinase B) (Wang et al., 2003) phosphoryliert, letztere kann einen Insulin-induzierten Anstieg der Rezeptoranzahl an der Synapse vermitteln (Wang et al., 2003). Y365 und Y367 der $\gamma 2$ -Untereinheit werden durch Fyn- und andere Src-Kinasen phosphoryliert (Jurd et al., 2010; Lu et al., 1999; Moss et al., 1995) und spielen neben den Serinen der β -Untereinheiten eine wichtige Rolle in der

Clathrin-vermittelten Endocytose (Kittler et al., 2005, 2008, vgl. 1.3.1). Die phosphorylierten Serine innerhalb der $\gamma 2$ -Untereinheit beeinflussen dagegen die synaptische Akkumulation der Rezeptoren (Meier und Grantyn, 2004; Muir et al., 2010).

Palmitoylierung der $\gamma 2$ -Untereinheit erfolgt an fünf cytoplasmatischen Cystein-Resten durch das Golgi-spezifische DHHC-Zink-Finger-Protein (GODZ) – eine Palmitoyltransferase – was eine Rezeptor-Akkumulation an der synaptischen Membran zur Folge hat (Keller et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verschiedene Lysine der GABA_AR- α -, - $\beta 3$ - und - $\gamma 2$ -Untereinheiten ubiquitiniert werden. Dieser Prozess wird in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität reguliert und führt zum irreversiblen Abbau der Untereinheiten (Arancibia-Carcamo et al., 2009; Saliba et al., 2007).

Auch die ECDs unterliegen posttranslationalen Modifikationen. So ist eine Glykosylierung der $\beta 2$ -Untereinheit eines assemblierten GABA_ARs Voraussetzung für deren Eintritt in die Exocytose (Lo et al., 2010). Zudem weisen GABA_ARs mit einer N-glykosylierten $\alpha 1$ -Untereinheit eine erhöhte Halbwertszeit an der Synapse auf (Buller et al., 1994).

1.3 Plastizität GABAerger Synapsen

1.3.1 Exo- und Endocytose von inhibitorischen GABA_A-Rezeptoren

Die funktionelle Lokalisation der GABA_ARs an der Zelloberfläche wird auf der Ebene der Rezeptor-Assemblierung in heteropentamere Komplexe kontrolliert. Dies gewährleistet (für den GABA_AR-Subtyp $\alpha 1\beta 2\gamma 2$) eine – aus dem synaptischen Spalt betrachtete – Anordnung gegen den Uhrzeigersinn in Form von $\gamma\text{-}\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta\text{-}\alpha$ (Baumann et al., 2001, 2002; Baur et al., 2006), wobei in extrasynaptischen Rezeptoren die Position der δ - vom Typ der vertretenen α -Untereinheit abhängt (Sigel et al., 2009).

Die Assemblierung von Komplexen, die zur Zelloberfläche transportiert werden, benötigt zuerst die Bildung von $\alpha\beta$ -Heterodimeren. Spezifische Bereiche der N-terminalen Sequenz kontrollieren die Rezeptor-Oligomerisierung und vermitteln somit die Assemblierung definierter Untereinheiten, wobei diese um ihren präferierten Interaktionspartner konkurrieren (Ehya et al., 2003; Hales et al., 2005; Kittler et al., 2002; Sarto-Jackson et al., 2006; Taylor et al., 1999). Während die Bildung von $\alpha\beta$ -Pentameren in Oberflächen-exponierten Rezeptoren resultiert (Brickley et al., 1999), werden Kombinationen aus $\alpha\gamma$ - oder $\beta\gamma$ -Untereinheiten im ER zurückgehalten (Connolly et al., 1996).

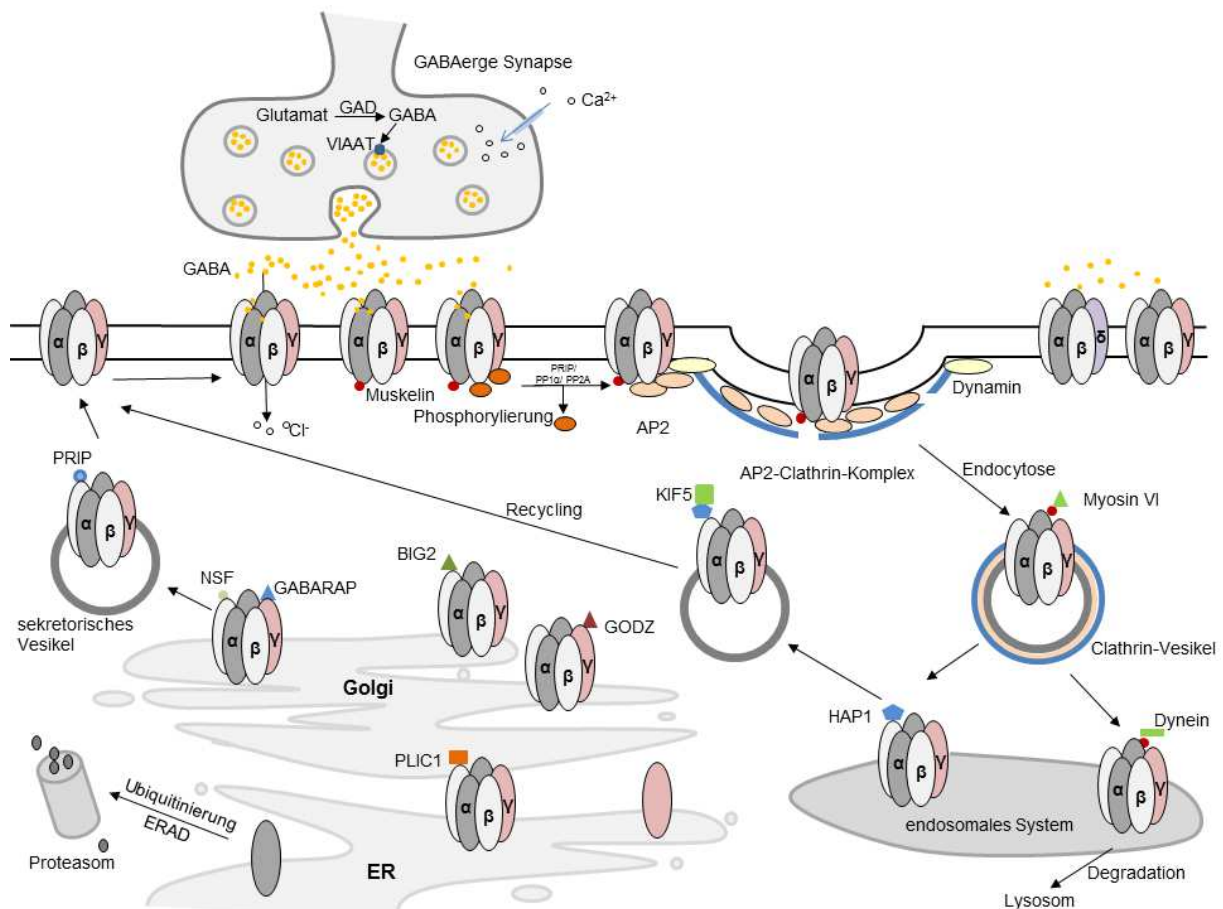


Abb.1.5: Synthese und Transport von GABA_A-Rezeptoren. Die Rezeptoren werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und reifen auf ihrem Weg durch den Golgi-Apparat, bevor sie über sekretorische Vesikel in extrasynaptischen Bereichen in die Plasmamembran inseriert werden. Mittels lateraler Diffusion gelangen die Rezeptoren zur Synapse, wo sie nach GABA-Bindung phasische Inhibition vermitteln. Extrasynaptische Rezeptoren reagieren dagegen auf geringere GABA-Konzentrationen, was in tonischer Inhibition resultiert. Phosphorylierung kann die Rezeptor-Funktion ändern, aber auch die Clathrin-vermittelte Endocytose über den AP2-Komplex regulieren. Nach erfolgter Internalisierung der Rezeptoren werden diese entweder recycelt und wieder in die Plasmamembran inseriert oder über das Lysosom bzw. nach Ubiquitinierung über das Proteasom degradiert (modifiziert nach Tretter und Moss 2008; Heisler et al., 2012).

Nach erfolgreicher Assemblierung im ER werden die Rezeptoren zum Golgi-Apparat übermittelt, in Vesikel verpackt und mittels Sekretion zur Plasmamembran transportiert und in diese inseriert (Abb.1.5). Initial wird dies durch die Interaktion der α - und β -Untereinheiten über deren intrazellulären Loop mit PLIC-1 (*protein that links integrin-associated protein with the cytoskeleton-1*) vermittelt (Bedford et al., 2001). PLIC-1 inhibiert die ER-assoziierte Degradation (ERAD) (Gallagher et al., 2007) sowie Ubiquitinierung der α - und β -Untereinheiten, was zu einer vermehrten Oberflächenexpression führt (Bedford et al., 2001). Weiterhin wird die Translokation γ -enthaltender GABA_ARs durch die GODZ-vermittelte Palmitoylierung reguliert (Keller et al., 2004).

Der Brefeldin A-inhibierte GDP/ GTP Austauschfaktor 2 (BIG2) interagiert mit einem Sequenzmotiv innerhalb der GABA_AR-β-Untereinheit (Charych et al., 2004). Die GEF- (*guanine exchange factor*-) Aktivität dieses G-Proteins wird für die Bildung und Abschnürung von Vesikeln vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) benötigt, die nachfolgend mit der Plasmamembran fusionieren (Shin et al., 2004) (Abb.1.5).

GABARAP (GABA_AR-assoziiertes Protein) gehört zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine und interagiert mit allen GABA_AR-γ2-Untereinheiten sowie Mikrotubulis (Wang et al., 1999). Das Protein liegt angereichert im Golgi-Apparat, in Vesikeln und anderen somatodendritischen Membrankompartimenten vor, ist aber an Synapsen nicht vertreten (Kittler et al., 2001; Kneussel et al., 2000). GABARAP scheint die Translokation von GABA_ARs zur Zelloberfläche zu vermitteln (Leil et al., 2004), wobei ein unspezifischer Mechanismus vermutet wird (Knight et al., 2002) (Abb.1.5).

Die Phospholipase-C-verwandten katalytisch inaktiven Proteine 1 und 2 (PRIP1/2) – Adapter-Proteine für GABA_AR-assoziierte Phosphatasen und Kinasen (Kanematsu und Hirata, 2002) – sowie NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) – ATPase und Chaperon des SNARE-Komplexes – scheinen ebenfalls am Transport von Neurotransmitter-Rezeptoren beteiligt zu sein (Morgan und Burgoyne, 2004; Zhao et al., 2007). Beide interagieren mit GABA_ARs indirekt über GABARAP oder über ihre β-Untereinheiten (Goto et al., 2005; Kanematsu und Hirata, 2002) und regulieren die Anzahl der GABA_ARs an der Oberfläche (Abb.1.5).

Nach dem Transport zur Zelloberfläche werden die Rezeptoren in die Zellmembran inseriert (Abb.1.5). Sowohl die Exo- als auch Endocytose von Rezeptoren findet in extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran statt (Bogdanov et al., 2006). Die Endocytose der GABA_A-Rezeptoren unterliegt hauptsächlich Clathrin- und Dynamin-abhängigen Mechanismen, die durch Interaktionen der GABA_AR-β- und -γ2-Untereinheiten mit dem Clathrin-Adapter-Protein 2 (AP2) vermittelt werden (Kittler et al., 2000; 2005; 2008). Die Rezeptoren werden anschließend entweder „recycelt“ und gelangen über den vesikulären Transportweg wieder zur Zelloberfläche oder werden zu den späten Endosomen transportiert und für lysosomale Degradation markiert (Kittler et al., 2004). Als AP2-Bindemotiv wurde ein Dileucin-Motiv (L343, L344) innerhalb des β2-Loops postuliert (Herring et al., 2003). Kittler und Kollegen zeigten zusätzlich ein atypisches basisches 10 Aminosäuren umfassendes Motiv in den GABA_AR-Untereinheiten β1-3 sowie ein 12 Aminosäuren langes Motiv, das dem der β-Untereinheiten entspricht und ein C-terminales YGYECL-Motiv in der γ2-Untereinheit. Alle interagieren mit der μ2-Untereinheit des AP2-Komplexes, wobei die γ2-Motive kooperativ mit separaten Domänen interagieren. Die Interaktion wird verstärkt, wenn die in der Sequenz enthaltenden Serine bzw. Tyrosine (vgl.

1.2.2.2) unphosphoryliert vorliegen, wohingegen die Phosphorylierung zu einer verminderten Internalisierung der Rezeptoren führt (Kittler et al., 2005; Kittler et al., 2008).

Die Phosphorylierungs-abhängige Endocytose der β -Untereinheit ist weiterhin durch die Interaktion mit PRIP1/2 und dessen Funktion als Adapter für die Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen PP1 α und PP2A (Protein Phosphatase 1 α / 2A) reguliert (Kanematsu et al., 2006; Terunuma et al., 2004). Durch die Phosphorylierung von PRIP wird PP1 α aktiviert und es kommt zur Dephosphorylierung der β 3-Untereinheit im Bereich der AP2-Bindestelle (Terunuma et al., 2004), wodurch eine Bindung des AP2-Komplexes möglich wird (Abb.1.5).

An der Rezeptor-Internalisierung ist auch das Transport-Protein Muskelin beteiligt. Dieses bindet spezifisch an die GABA $_A$ R- α 1-Untereinheit und rekrutiert die entsprechenden Rezeptoren in extrasynaptische Bereiche. Nach erfolgter Internalisierung kommt es zum Muskelin-abhängigen Transport über das Endosom zum Lysosom (Heisler et al., 2011).

Die generelle Entscheidung, wann ein internalisierter Rezeptor „recycelt“ oder degradiert wird, erfolgt über die Interaktion des Huntingtin-assoziierten Proteins 1 (HAP1) mit den GABA $_A$ R-Untereinheiten β 1-3 (Kittler et al., 2004) (Abb.1.5). HAP1 interagiert mit Huntingtin (*Huntington disease protein*) (Li et al., 1995) und ist in den Motor-Protein-abhängigen Transport neuronaler Proteine involviert (Engelender et al., 1997; Gauthier et al., 2004).

1.3.2 Homöostatische Plastizität GABAerger Synapsen

Sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Synapsen unterliegen einer hohen Dynamik, die auf komplexe Art und Weise reguliert wird, wobei alle an der Prä- und Postsynapse enthaltenen Proteine sowie die Balance zwischen neuronaler Anregung und Inhibition (homöostatische Plastizität) dazu beitragen. Laterale Diffusion in der Plasmamembran ermöglicht dabei einen ständigen Austausch von synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren und somit eine dynamische Kontrolle der GABAergen Transmission (Jacob et al., 2008). Ist diese nicht gegeben, kommt es zu Dysfunktionen, die in neuropsychiatrischen Krankheiten resultieren. Auf die Interaktion mit dem Gerüst-bildenden Protein Gephyrin, das die Rezeptoren an der Postsynapse stabilisiert und dadurch die laterale Diffusion und/oder Internalisierung verhindert, wird im Folgenden genauer eingegangen (vgl. 1.4).

Die homöostatische Plastizität von GABA $_A$ -Rezeptoren kann unter anderem durch die Aktivität exzitatorischer Glutamat-Rezeptoren (GluR) moduliert werden. Der verstärkte Ca $^{2+}$ -Einstrom durch NMDA-Rezeptoren aktiviert die Phosphatase Calcineurin, die wiederum an GABA $_A$ Rs rekrutiert wird und die Dephosphorylierung von S327 der GABA $_A$ R- γ 2-Untereinheit vermittelt, was in verstärkter GABA $_A$ R-Mobilität resultiert. Dieser Prozess ist Dynamin-unabhängig und unterliegt somit keiner Endocytose der Rezeptoren, stellt aber einen Mechanismus zur Regulation der lateralen Mobilität sowie Verweildauer von GABA $_A$ Rs in

synaptischen bzw. extrasynaptischen Bereichen dar (Muir et al., 2010). Eine Beteiligung von cytoplasmatischen Strukturproteinen wie beispielsweise Gephyrin, die durch die Stabilisierung der Rezeptoren an der Synapse vermutlich zu diesem regulativen Mechanismus beitragen, konnte bisher nicht gezeigt werden.

1.4 Das postsynaptische Strukturprotein Gephyrin

1.4.1 Funktion und Struktur von Gephyrin

Gephyrin wurde als säugerspezifisches, cytoplasmatisches 83 kDa Polypeptid identifiziert, das mit dem Glycin-Rezeptor aus dem Rückenmark von Ratten kogereinigt wurde (Pfeiffer et al., 1982). Gephyrin ist ein multifunktionales Protein mit enormer Bedeutung für die Clusterung von inhibitorischen Rezeptoren in postsynaptischen Bereichen sowie für die Molybdän-Cofaktor-(Moco-)Synthese in nicht-neuronalen Geweben (Feng et al., 1998; Kirsch et al., 1993; Prior et al., 1992; Sola et al., 2004), wobei gezeigt wurde, dass im Gehirn – in Astrozyten – ebenfalls Moco synthetisiert wird (Smolinsky et al., 2008). Basierend auf den unterschiedlichen Funktionen konnte für neuronales Gephyrin eine Lokalisation an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Triller et al., 1985), wohingegen nicht-neuronales Gephyrin eine cytosolische Verteilung aufweist (Nawrotzki et al., 2012).

Gephyrin besteht aus drei Domänen, der 20 kDa umfassenden N-terminalen G-Domäne und der C-terminalen E-Domäne (43 kDa), die durch die zentrale C-Domäne (18-21 kDa) miteinander verbunden werden. Die Bezeichnung der einzelnen Domänen lässt sich von den homologen bakteriellen Proteinen MogA (G-Domäne) und MoeA (E-Domäne) herleiten (Abb.1.6) (Schwarz et al., 2001; Sola et al., 2004). Aufgrund der essentiellen Funktion des Proteins in der Molybdän-Cofaktor-Synthese, wo es den letzten Schritt der Molybdän-Insertion in den Apo-Cofaktor vermittelt (Schwarz, 2005), ist es in allen Organismenreihen vertreten. In Pflanzen wurde es als Cnx1 erstmals beschrieben, das verglichen mit Gephyrin eine umgekehrte Anordnung der beiden Domänen aufweist. Des Weiteren fehlt die C-Domäne, die nur in Gephyrin vertreten ist und daher auf eine Bedeutung in der neuronalen Funktion hinweist. Die Konservierung der anderen beiden Domänen lässt vermuten, dass sowohl Gephyrin als auch Cnx1 in zwei unabhängigen Fusionen von Vorläuferproteinen entstanden sind, die in einer unterschiedlichen Anordnung der Domänen resultiert (Stallmeyer et al., 1995), während in Bakterien ihre Aktivitäten weiterhin getrennt exprimiert werden.

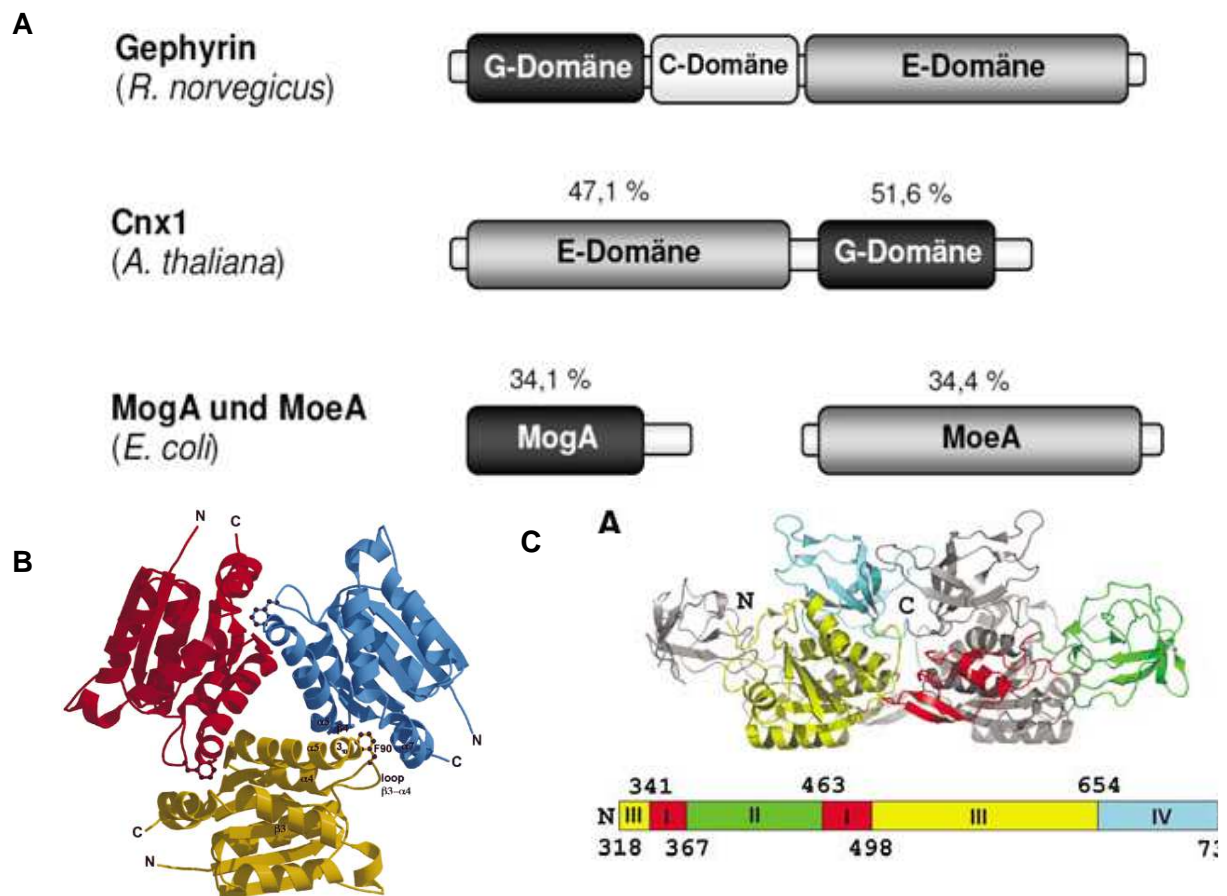


Abb.1.6: Aufbau der homologen Proteine Gephyrin, Cnx1, MogA und MoeA sowie die Kristallstruktur der Gephyrin E- und G-Domäne. (A) G- und E-Domäne der Proteine Gephyrin und Cnx1 sind homolog zu den bakteriellen Proteinen MogA bzw. MoeA. Während es sich bei letzteren um einzelne Proteine handelt, sind diese in Gephyrin und Cnx1 in inverser Anordnung fusioniert, wobei Gephyrin zusätzlich eine verbindende C-Domäne aufweist. Die Prozentangaben geben Auskunft über die Homologie zum Gephyrin (modifiziert nach Stallmeyer et al., 1995). (B) Die isolierte G-Domäne bildet in Lösung trimere (Schwarz et al., 2001), während (C) die E-Domäne ein dimeres Verhalten aufweist (Kim et al., 2006). Die verschiedenen Subdomänen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt.

Die isolierte Gephyrin E-Domäne bildet Dimere (Kim et al., 2006), während die G-Domäne ein trimeres Verhalten aufweist (Schwarz et al., 2001) (Abb.1.6). Dies lässt die Ausbildung eines strukturierten Netzwerkes für die Aggregation/ Clusterung des Holo-Proteins vermuten, wobei fraglich ist, wie diese reguliert wird und ob diese auf synaptische Bereiche beschränkt bleibt. Möglicherweise tragen posttranslationale Modifikationen sowie die Interaktion mit anderen Proteinen zur Bildung des Netzwerkes und seiner Regulation bei (Fritschy et al., 2008). Die dreidimensionale Struktur der C-Domäne ist bisher nicht aufgeklärt, jedoch lassen eine Vielzahl von Interaktionspartnern sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber proteolytischer Degradation (Herweg und Schwarz, 2012) eine

intrinsische, ungefaltete und im Gesamtprotein flexible Domäne erwarten (Fritschy et al., 2008).

Für das Gephyrin-Gesamtprotein wird daher entweder die Bildung eines hexameren Gephyrin-Netzwerkes mit sechs Gephyrin-Molekülen, die drei GlyRs binden (Sola et al., 2004) oder eine Aggregation/Interaktion von Gephyrin-Trimeren mit jeweils einem assoziierten GlyR (Fritschy et al., 2008) vermutet. Letzteres Modell besagt weiterhin, dass eine Gephyrin-Einheit (Trimer) vom Netzwerk entfernt sowie diesem zugefügt werden kann, wodurch es als ein stabiles, aber gleichzeitig mobiles Gerüst in Dendriten fungieren könnte (Calamai et al., 2009; Dobie und Craig, 2011). Dabei läge ein G-Domänen-Trimer im Kern und wäre von drei E-Domänen umgeben. Die GlyR-Bindestelle sowie die Dimerisierungsfläche wären weiterhin zugänglich (Fritschy et al., 2008). Diese Theorie wird durch neuere Studien, in denen neben Gephyrin-Trimeren und -Hexameren auch Nona- und Dodecamere gezeigt werden, unterstützt (Herweg und Schwarz, 2012).

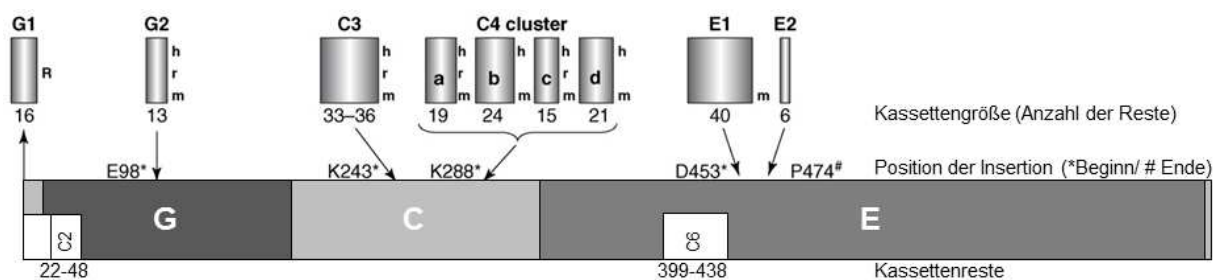


Abb.1.7: Schematische Übersicht der verschiedenen Gephyrin-Spleiß-Varianten innerhalb der einzelnen Domänen. Dargestellt sind Kassettengröße sowie Position der identifizierten Varianten aus den Organismen *H. sapiens* (h), *R. norvegicus* (r) und *M. musculus* (m), wobei sich die angegebenen Aminosäuren auf Gephyrin ohne zusätzliche Spleiß-Kassette beziehen. Die Insertionen C2 und C6 basieren auf konstitutiv gespleißten Exons und sind daher nicht in der Nomenklatur enthalten (Meier et al., 2000; Prior et al., 1992) (modifiziert nach Fritschy et al., 2008).

Das Gephyrin-codierende Gen (GPHN) weist eine komplexe Intron-Exon Struktur auf und eine Vielzahl an Spleiß-Varianten wurden identifiziert (Abb.1.7), die möglicherweise die funktionelle Diversität von Gephyrin erklären (Fritschy et al., 2008; Meier et al., 2000; Prior et al., 1992). Die verschiedenen Varianten weisen vor allem eine Gewebe-spezifische Expression auf (Ramming et al., 2000), was vermuten lässt, dass die einzelnen Isoformen verschiedene Funktionen in Neuronen oder im Metabolismus übernehmen bzw. auf diese beschränkt sind. Während verschiedene Insertionen (Spleiß-Kassetten) innerhalb der C-Domäne die neuronale Gephyrin-Funktion modulieren, interferieren Einschübe in der G- bzw. E-Domäne mit der metabolischen Funktion (Smolinsky et al., 2008). Die höchste

Variabilität ergibt sich dabei innerhalb der C-Domäne des Proteins, der Domäne, die wahrscheinlich für die neuronale Funktion von Gephyrin von besonderer Bedeutung ist, wodurch eine vielfältige Modulation möglich sein könnte. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die C3-Kassette überwiegend in der Leber exprimiert wird und dort den Hauptanteil der Moco-Biosynthese übernimmt (Paarmann et al., 2006). Diese Spleiß-Variante ist zwar auch im Gehirn vertreten, aber hauptsächlich in Gliazellen, in denen sie ebenfalls für die lokale Moco-Synthese zuständig ist (Smolinsky et al., 2008). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den C4-Kassetten, insbesondere der C4c-Variante, um eine verstärkt neuronal exprimierte Form, die gehäuft mit dem Glycin-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, was eine Funktion in der Clusterung inhibitorischer Rezeptoren vermuten lässt. Ein Nachweis in der Leber war für diese Variante jedoch ebenfalls möglich (Paarmann et al., 2006). Herweg und Schwarz (2012) konnten im direkten Vergleich der C3- und C4c-Spleiß-Variante eine deutlich höhere Bindungsaffinität des GlyRs zu letzterer nachweisen, was die zuvor beschriebenen Beobachtungen bestätigt. Ein direkter Einfluss auf die Rezeptor-Clusterung konnte noch nicht gezeigt werden. Eine weitere Charakterisierung vor allem der Spleiß-Varianten in der C-Domäne ist notwendig, um die Regulation der enzymatischen Aktivität von Gephyrin sowie dessen Clusterung in unterschiedlichen Synapsen-Typen zu verstehen (Fritschy et al., 2012).

1.4.2 Posttranslationale Modifikationen von Gephyrin

Bereits frühe Studien zeigten, dass es sich bei Gephyrin um ein Phosphoprotein handelt (Langosch et al., 1992), wobei zu diesem Zeitpunkt spezifische Phosphorylierungsstellen sowie die beteiligten Kinasen noch weitgehend unbekannt waren. Erst innerhalb der letzten fünf Jahre konnten einige detailliertere Informationen diesbezüglich gesammelt werden. So ist die Interaktion zwischen Gephyrin und Pin1 (Peptidyl-Prolyl Isomerase NIMA interagierendes Protein 1) Phosphorylierungs-abhängig, erfolgt über eine Prolin-reiche Region mit drei essentiellen phosphorylierten Serinen (S188, S194, S200) innerhalb der C-Domäne und resultiert in einer Konformationsänderung des Gephyrins (Zita et al., 2007).

Dagegen führt die Inhibition der Phosphatasen PP1 α und PP2A zu einer signifikanten Reduktion synaptischer Gephyrin-Cluster (Bausen et al., 2010), was eine direkte oder indirekte Regulation der Clusterung durch Serin-/Threonin-Kinasen vermuten lässt.

Am Serin 270 wird Gephyrin durch die Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) phosphoryliert. Diese Phosphorylierungsstelle scheint vor allem einen Einfluss auf die Oligomerisierung von Gephyrin zu haben, wobei eine Phosphorylierung die Anzahl der Gephyrin-Cluster an der Synapse reduziert (Tyagarajan et al., 2011). Eine weitere Beteiligung an der Phosphorylierung des S270 wurde der CDK5 (Cyclin-abhängige Kinase 5)

sowie verwandten CDKs zugesprochen (Kuhse et al., 2012), die in Abhängigkeit von Collybistin, einem weiteren Gephyrin-Liganden, die Gephyrin-Clusterung an der Synapse beeinflussen. In einer weiteren Studie von Herweg (2012) konnten mittels massenspektrometrischer Analysen das S270 sowie 18 weitere Phosphorylierungsstellen innerhalb des Gephyrins (S188, S194, S200, T198, T199, T205, S222, S226, T227, T266, S268, T276, S277, S280, T281, S283, S295 sowie T324) identifiziert werden, wobei alle bis auf eine in der C-Domäne lokalisiert vorlagen. Vier davon waren ausschließlich in der C4-Spleißvariante vertreten. Vor allem der Casein-Kinase II sowie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Erk werden dabei regulative Funktionen in der Gephyrin-Clusterung zugewiesen (Herweg und Schwarz, 2012). Insbesondere für das T324 in der Gephyrin E-Domäne konnte bereits ein Einfluss auf die Oligomerisierung und Clusterung gezeigt werden (Herweg, 2012). Des Weiteren zeigten Kuhse und Kollegen (2012) ebenfalls mittels Massenspektrometrie die Phosphorylierung von T266, S268, T276, S277, S280, S283, S295 sowie zusätzlich des T286 innerhalb der Gephyrin C-Domäne. Neure Studien weisen außerdem auf eine Palmitoylierung des Gephyrins an verschiedenen Cystein-Resten hin (Dejanovic et al., unveröffentlichte Daten).

1.4.3 Gephyrin-Interaktionspartner

Für die gerüstbildenden Eigenschaften des Gephyrins sind zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen notwendig, die zur Regulation des Transports sowie der Clusterung des Proteins beitragen, wobei die C-Domäne die meisten regulatorischen Bereiche und Bindestellen aufweist. In Bezug auf den Gephyrin-Transport konnte sowohl eine Aktinfilament- als auch eine Mikrotubuli-abhängige Bewegung nachgewiesen werden. Über die E-Domäne interagiert Gephyrin mit Mitgliedern der *mammalian enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein* Familie (Mena/VASP) (Giesemann et al., 2003), wodurch Gephyrin mit dem Aktin-Cytoskelett verknüpft wird. Dies erfolgt durch die Rekrutierung von G-Aktin und Profilin, das ebenfalls mit Gephyrin über dessen E-Domäne interagiert (Mammoto et al., 1998). Dabei vermitteln Profilin 1 und 2 die G-Aktin-Aufnahme in filamentöses Aktin durch Stimulierung der ADP-ATP-Austauschreaktion des Aktinmonomers (Finkel et al., 1994) und interagieren über Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) mit der Membran (Schluter et al., 1997). Die Interaktion von Gephyrin mit polymerisiertem Tubulin erfolgt wahrscheinlich über dessen C-Domäne; ein potentielles tau-Motiv könnte hierfür verantwortlich sein. Aufgrund seiner Bindung an Mikrotubuli wurde angenommen, dass Gephyrin ein Mikrotubuli- sowie Mikrofilament-assoziiertes Protein-Netzwerk ausbildet und somit die Lokalisation von Rezeptoren und anderen Proteinen an der postsynaptischen Membran regulieren und mit dem Cytoskelett verknüpfen kann (Kirsch et

al., 1991; Ramming et al., 2000). Außerdem interagiert Gephyrin über seine C-Domäne mit den leichten Ketten des Dyneins (*dynein light chains*, DLC) 1 und 2 (Fuhrmann et al., 2002).

Die Interaktion mit RAFT1 (*rapamycin and FKB12 target (FRAP/mTOR)*) über die Gephyrin E-Domäne beeinflusst dagegen die Proteintranslation durch Phosphorylierung der S6 Kinase (pp70S6k), die wiederum einen Repressor der Proteintranslationsinitiation phosphoryliert (Sabatini et al., 1999). Dies lässt eine Involvierung von Gephyrin in die Signaltransduktion der Translationskontrolle in der Synapse vermuten (Kneussel und Betz, 2000; Sabatini et al., 1999), ein Prozess, dem eine steigende Bedeutung in der Kontrolle der Proteinhomöostase an der Membran zugeschrieben wird.

Weiterhin bindet Gephyrin über seine C-Domäne auch an GABARAP, das gleichzeitig eine Bindestelle für Mikrotubuli (Maas et al., 2006) und die GABA_AR- γ 2-Untereinheit aufweist (Wang et al., 1999). Eine Interaktion von Collybistin (CB), einem RhoGEF (Nukleotidaustauschfaktor) spezifisch für Cdc42, über die Gephyrin C-Domäne sowie dem N-Terminus der E-Domäne konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Kins et al., 2000). Collybistin ist ein Mitglied der Dbl-Familie von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs), das selektiv die kleine GTPase Cdc42 aktivieren kann und mit Gephyrin über dessen C-Domäne interagiert (Kins et al., 2000; Reid et al., 1999). Die Gephyrin- und Cdc42-Bindestelle auf Collybistin überlappen, was eine exklusive Bindung eines Proteins vermuten lässt (Xiang et al., 2006) und zu der Annahme führt, dass Cdc42 für eine Gephyrin-Aggregation verzichtbar ist (Reddy-Alla et al., 2010). In der Ratte existieren drei verschiedene Collybistin Spleiß-Varianten, die sich hauptsächlich durch Änderungen am C-Terminus unterscheiden (Fritschy et al., 2012). Die CB-2 und -3 Spleiß-Varianten können mit und ohne *Src-homology-3*-(SH3)-Domäne vorkommen, wobei die Anwesenheit der SH3-Domäne CB in einer inaktiven Konformation hält. NL2 und GABA_AR- α 2 (und auch - α 3) können CB-Isoformen mit SH3-Domäne durch Bindung dieser an ihr C-terminales Polyprolinmotif aktivieren (Poulopoulos et al., 2009; Saiepour et al., 2010). Dies bewirkt eine Konformationsänderung, die die Autoinhibition der GEF-Domäne des Collybistins aufhebt und damit die Oberflächen-Translokation von Gephyrin und GABA_ARs ermöglicht (Poulopoulos et al., 2009). Auch eine Interaktion von Gephyrin mit Neuroligin 2 (NL 2), das ausschließlich an GABAergen Synapsen vertreten ist, konnte gezeigt werden. Neuroligin 2 bindet ebenfalls Collybistin, was zur Ausbildung eines ternären Komplexes führt, der die Bildung von Gephyrin-Clustern in GABAergen Bereichen maßgeblich unterstützt und auch an der Regulation der Cluster beteiligt ist (Poulopoulos et al., 2009).

1.4.4 Gephyrin-Interaktion mit dem Glycin-Rezeptor

Rezeptoren unterliegen innerhalb der Plasmamembran der freien Diffusion auf Grundlage der Brown'schen Molekularbewegung, die durch eine hochaffine Bindung an Gerüstproteine extrem verlangsamt wird. Für den Glycin-Rezeptor wird dies durch das cytosolische Protein Gephyrin vermittelt (Calamai et al., 2009; Kirsch et al., 1993). Nachdem bereits 1982 die Interaktion der beiden Proteine durch eine Koreinigung gezeigt werden konnte (Pfeiffer et al., 1982), beschäftigten sich viele weitere Studien mit der Charakterisierung dieser Bindung. So wurde eine amphipatische Sequenz des intrazellulären Loops der GlyR- β -Untereinheit identifiziert, die an die Dimerisierungs-Fläche zwischen zwei Gephyrin E-Domänen bindet (Kim et al., 2006; Sola et al., 2004). Mittels Isothermaler-Titrationskalorimetrie konnte ein biphasisches Bindungsverhalten mit einer hochaffinen (Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich) und einer niedrigaffinen (mikromolare Bindungsaffinität) Bindungsstelle ermittelt werden (Schrader et al., 2004). Die Kristallstruktur einer dimerisierten E-Domäne mit gebundenem GlyR- β -Loop gibt allerdings nur Auskunft für eine dieser Bindungsstellen (Abb.1.8) (Kim et al., 2006), woraus erkennbar ist, dass die 13 für die Bindung nötigen Reste des GlyR- β -Loops eine C-förmige Struktur bilden und genau in eine Vertiefung, die sich aus den Subdomänen III und IV des einen und der Subdomäne IV (vgl. Abb.1.6) des zweiten E-Domänen Monomers ergibt, passen (Abb.1.8). Der Komplex zwischen Aminosäuren des Gephyrins und des Rezeptor-Loops wird durch hydrophobe Interaktionen sowie einigen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Von besonderer Bedeutung für die Interaktion sind dabei die hydrophoben Reste Phenylalanin 330 und Prolin 713 innerhalb des Gephyrins. Werden diese verändert, so kommt es zu einem vollständigen Verlust der Gephyrin-Rezeptor-Interaktion (Kim et al., 2006).

Bei der Bindung zwischen dem Rezeptor und Gephyrin handelt es sich um einen dynamischen Prozess, so dass durch Änderungen dieser Interaktion das Equilibrium zwischen synaptisch und extrasynaptisch lokalisierten GlyRs verschoben und somit die Stärke der inhibitorischen Neurotransmission moduliert werden kann. Eine Möglichkeit, dies zu regulieren, bietet die Phosphorylierung der beteiligten Proteine. Die bereits beschriebene durch die phosphorylierungs-abhängige Bindung von Pin1 bewirkte Konformationsänderung von Gephyrin verstärkt die Bindung der GlyR- β -Untereinheit (Zita et al., 2007), was die Bedeutung von Proteinkinasen in der Regulation der Gephyrin- und/ oder GlyR-Clusterung aufzeigt (Fritschy et al., 2008). Specht und Kollegen (2011) konnten nachweisen, dass eine PKC-Phosphorylierungsstelle im intrazellulären GlyR- β -Loop einen negativen Effekt auf die Gephyrin-Bindung zur Folge hat. Die Phosphorylierung des Serins 403 reduziert die Affinität des Rezeptors zu Gephyrin, erhöht somit die Rate der Membran-Diffusion und reduziert die Anzahl synaptischer Glycin-Rezeptoren. Dies erfolgt vermutlich extrasynaptisch, da der

unphosphorylierte GlyR- β -Loop an der Synapse fest an Gephyrin gebunden vorliegt, eine geringe Dissoziationsrate aufweist (Schrader et al., 2004; Grünwald et al., unveröffentlichte Daten) und für die PKC wahrscheinlich unzugänglich ist (Specht et al., 2011).

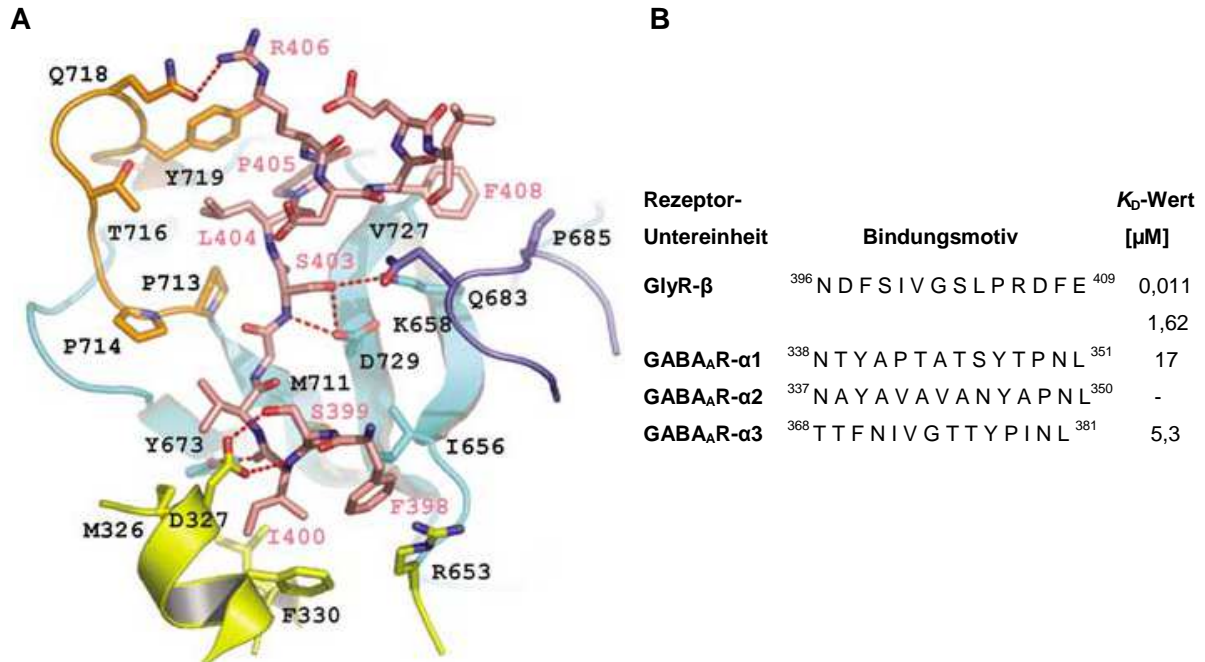


Abb.1.8: Kristallstruktur der Gephyrin E-Domäne mit gebundenem GlyR- β -Loop sowie Gephyrin-Bindungsstellen auf dem GlyR- β - und den GABA_AR- α 1-3-Loops. (A) Die Kokristallisation der Gephyrin E-Domäne mit dem GlyR- β -Loop identifizierte die an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Die C-förmige Struktur des Loops passt genau in die aus zwei E-Domänen gebildete Tasche, wobei der Komplex zwischen beiden Proteinen durch hydrophobe Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird (Kim et al., 2006). (B) Aminosäuresequenz der Gephyrin-Bindungsstellen auf den verschiedenen GlyR- β und GABA_AR- α 1-3-Loops sowie durch ITC-Messungen ermittelte K_D -Werte. Für den GlyR- β -Loop ergab sich ein biphasisches Bindungsverhalten an Holo-Gephyrin (Specht et al., 2011), während die GABA_AR- α 1-3-Loops eine monophasische Bindung an die Gephyrin E-Domäne aufweisen (modifiziert nach Maric et al., 2011).

Gephyrin spielt nicht nur eine Rolle bei der synaptischen Lokalisation des Glycin-Rezeptors, sondern bindet den Rezeptor auch außerhalb der Synapse (Ehrensperger et al., 2007). Dies könnte mit der Beobachtung zusammenhängen, dass Gephyrin auch am antero- und retrograden Transport des GlyRs über Mikrotubuli beteiligt ist, was eine Bindung von nicht aggregiertem Gephyrin an den Rezeptor vermuten lässt (Hanus et al., 2004). Der retrograde Transport erfolgt dabei über die Bindung von Gephyrin an DLC1 bzw. 2 (Fuhrmann et al., 2002), wohingegen der anterograde Transport über die Interaktion zu KIF5 (Motorproteine der Kinesin-Superfamilie 5) vermittelt wird (Maas et al., 2009).

1.4.5 Gephyrin-Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor

Durch verschiedene Studien konnten neben einer Gephyrin-abhängigen auch eine Gephyrin-unabhängige Clusterung von GABA_ARs an postsynaptischen Bereichen gezeigt werden (Kneussel et al., 2001). Erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen Gephyrin und GABA_ARs – sei es direkt oder indirekt – lieferten Immunfärbungen von Neuronen. Im Gehirn sind GlyRs in der Minderheit, doch trotzdem war eine Vielzahl an Gephyrin-Clustern zu verzeichnen, was eine Kollokalisierung von Gephyrin mit anderen Rezeptoren, wie dem GABA_AR, vermuten ließ. Es konnte eine Kollokalisierung mit $\alpha 2/3$ -, $\beta 2/3$ - oder $\gamma 2$ -Untereinheiten-enthaltenden GABA_ARs gezeigt werden (Sassoe-Pognetto et al., 1995; Sassoe-Pognetto et al., 2000). Außerdem wiesen Gephyrin-*knock-out*-Mäuse einen Verlust von postsynaptischen $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$, nicht aber $\alpha 1$ und $\alpha 5$ GABA_AR-Clustern auf. Das Expressions-Niveau der einzelnen Untereinheiten blieb dabei unbeeinflusst (Kneussel et al., 2001; Kneussel et al., 1999). Zusätzlich konnte in HEK293-Zellen eine Kollokalisierung zwischen Gephyrin und der GABA_AR- $\beta 3$ -Untereinheit nachgewiesen werden (Kirsch et al., 1995). Außerdem wird der GABA_AR- $\gamma 2$ -Untereinheit eine enorme Bedeutung für die synaptische Lokalisation der Rezeptoren zugesprochen (Essrich et al., 1998), was durch das Fehlen von synaptischen GABA_AR- und Gephyrin-Clustern in $\gamma 2$ -*knock-out*-Mäusen unterstrichen wird (Gunther et al., 1995) und eine Interaktion mit Gephyrin vermuten lässt.

Eine direkte Interaktion konnte zuerst zwischen Gephyrin und der GABA_AR $\alpha 2$ -Untereinheit gezeigt werden. Eine minimale hydrophobe Sequenz, die die Aminosäuren 330-347 umfasst, ist für eine Gephyrin-abhängige Clusterung der Rezeptor-Untereinheit an der Synapse essentiell (Tretter et al., 2008). Darauf folgend konnten ebenfalls Gephyrin-Bindemotive in homologen Regionen der GABA_AR- $\alpha 1$ - und - $\alpha 3$ -Untereinheiten identifiziert werden (Abb.1.8) (Mukherjee et al., 2011; Saiepour et al., 2010; Tretter et al., 2011). Diese Regionen weisen in den verschiedenen α -Untereinheiten nur geringe Konservierung auf, was entweder eine unterschiedliche Bindestelle im Gephyrin oder einen wichtigen Einfluss der Faltung der Loops, die innerhalb der bindenden Untereinheiten konserviert sein könnten, vermuten lässt (Tretter et al., 2012).

Die Interaktion zwischen dem GlyR- β -Loop und Gephyrin erfolgt über Aminosäuren der E-Domäne (Abb.1.8) (Kim et al., 2006; Schrader et al., 2004). Eine Mutagenese der putativen Bindetasche zeigte, dass die Bindestelle für inhibitorische Rezeptoren evolutionär konserviert ist und alle Untereinheiten um diese Bindestelle konkurrieren (Maric et al., 2011; Saiepour et al., 2010; Tretter et al., 2011). Sowohl bei der Interaktion von Gephyrin mit dem GlyR, als auch mit den verschiedenen GABA_AR-Untereinheiten sind dieselben hydrophoben Aminosäuren (Phe330 und Pro713) essentiell für die Interaktion und unterstützen die Annahme einer konservierten Bindetasche innerhalb der E-Domäne (Kim et al., 2006; Maric

et al., 2011). Für den Glycin-Rezeptor konnte eine Kernsequenz identifiziert werden, die auch in der GABA_AR- α 3-Untereinheit konserviert ist und auf „FSIV“ (Aminosäuren 398-401) bzw. „FNIV“ (Aminosäuren 370-373) reduziert wurde. Außerdem ist in allen drei untersuchten GABA_AR- α -Untereinheiten ein Tyrosin konserviert, wobei die Phosphorylierung des Y375 der GABA_AR- α 1-Untereinheit die Gephyrin-Bindung signifikant reduziert (Maric et al., 2011).

ITC-Messungen mit der Gephyrin E-Domäne ergaben ein monophasisches Bindeverhalten für den GABA_AR- α 1- und - α 3-Loop mit Affinitäten im mikromolaren Bereich (α 1: $K_D = 17 \mu\text{M}$; α 3: $K_D = 5,3 \mu\text{M}$), während für das hydrophobe α 2-Peptid nur eine sehr schwache Bindung festgestellt wurde (Maric et al., 2011). Somit sind die Affinitäten der GABA_AR- α 1- und - α 3-Untereinheit zu Gephyrin ein bis zwei Zehnerpotenzen schwächer als im Vergleich zur GlyR- β Interaktion (Schrader et al., 2004; Sola et al., 2004). Da die GABA_AR- α 2-Untereinheit neben Gephyrin auch Collybistin bindet, kommt es zur Translokation von trimeren Collybistin-Gephyrin-GABA_AR- α 2 Komplexen zur Zellmembran, wodurch die ansonsten schwache Interaktion zwischen Gephyrin und der α 2-Untereinheit gestärkt wird. Die Gephyrin-GABA_AR- α 3 Interaktion benötigt dagegen diese Komplexbildung nicht (Saiepour et al., 2010).

Zusätzlich konnte in ersten Versuchen die direkte Interaktion der GABA_AR- β 2-, - β 3- sowie - δ -Untereinheit mit der Gephyrin E-Domäne in Kosedimentationsanalysen gezeigt werden. Diese Bindung wurde jedoch nicht weiter eingegrenzt und charakterisiert (Smolinsky, 2009).

Neben der Gephyrin-abhängigen Clusterung werden insbesondere die mobileren extrasynaptisch lokalisierten Rezeptoren unabhängig von Gephyrin geclustert. Dies erfolgt über das mit der α 5-Untereinheit interagierende Protein Radixin – ein Mitglied der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie, die Transmembranproteine mit dem Aktin-Cytoskelett verbindet (Christie und de Blas, 2002; Loeblich et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass die γ 2-Untereinheit nicht direkt am synaptischen *targeting*, möglicherweise aber über Palmitoylierung an der synaptischen Verankerung von GABA_ARs beteiligt ist (Tretter et al., 2012).

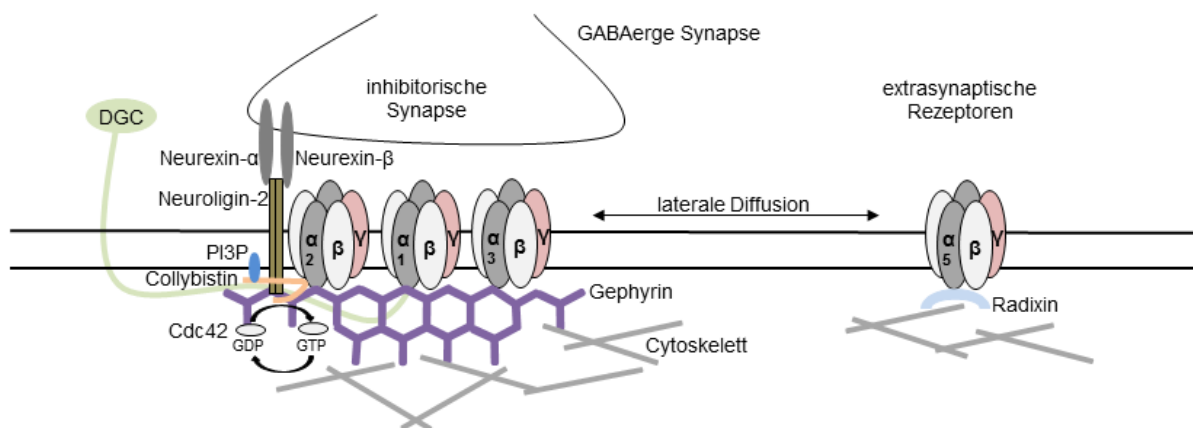


Abb.1.9: Schematische Darstellung einer GABAergen Synapse mit allen prä-/ post- und extrasynaptischen Proteinen. Die Zelladhäsions-Proteine Neuroigin-2 und Neurexin interagieren über den synaptischen Spalt wodurch sie die Synapse stabilisieren. Gephyrin interagiert mit den α 1-3-Untereinheiten des GABA_ARs und clustert diese in postsynaptischen Bereichen. An dieser Verankerung sind ebenso Collybistin und Neuroigin beteiligt. Beide binden Gephyrin, das durch Collybistin zur postsynaptischen Membran rekrutiert und dort über PI3P verankert wird. Collybistin interagiert gleichzeitig mit der GABA_AR- α 2-Untereinheit, die dadurch zusätzlich stabilisiert wird. Der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex bindet unabhängig von Gephyrin an die GABA_AR- α 1- und - α 2-Untereinheit, während extrasynaptische Rezeptoren über Radixin in der Membran geclustert werden (modifiziert nach (Papadopoulos und Soykan, 2011)).

1.5 Ziele der Arbeit

Gephyrin ist das wichtigste Protein der postsynaptischen Dichte inhibitorischer Synapsen. Es bildet ein cytoplasmatisches Netzwerk, durch das die Rezeptoren der postsynaptischen Membran an der Synapse stabilisiert werden. Die Interaktion zwischen Gephyrin und dem Glycin-Rezeptor wurde bereits im Detail studiert und charakterisiert (Kim et al., 2006; Schrader et al., 2004). Dagegen ist recht wenig über die Interaktion des Gerüst-bildenden Proteins mit GABA_A-Rezeptoren bekannt. Zu Beginn dieser Arbeit wurde lediglich eine direkte Interaktion mit der α 2-Untereinheit beschrieben und eingegrenzt (Tretter et al., 2008). Des Weiteren waren Hinweise auf eine direkte Bindung der GABA_AR-Untereinheiten β 2, β 3 und δ an die Gephyrin E-Domäne vorhanden (Smolinsky, 2009).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen und da eine β -Untereinheit für einen funktionellen GABA_A-Rezeptor unverzichtbar ist (Wan et al., 1997), sollte in dieser Arbeit eine detailliertere Charakterisierung der Bindung dieser Untereinheiten an Gephyrin vorgenommen werden. Dabei wurde zunächst nur die β 2-Untereinheit genauer betrachtet, da diese in dem mit 60 % am stärksten vertretenen GABA_AR-Subtyp (α 1 β 2 γ 2) vorzufinden ist (Connolly et al., 1996).

Mittels Kosedimentations-Analysen mit trunkierten Varianten des Loops sollte das Gephyrin-Bindungsmotiv innerhalb des $\beta 2$ -Loops eingegrenzt und in Hinblick auf eine mögliche Phosphorylierungs-abhängige Regulation untersucht werden. Ein Vergleich der ermittelten Bindesequenz mit homologen Bereichen der $\beta 3$ -Untereinheit sollte Aufschluss über eine mögliche Überlappung der Binderegionen geben. Des Weiteren sollte ebenfalls durch Kosedimentationen die Bindestelle der GABA_AR-Loops innerhalb des Gephyrins mit der des GlyR- β -Loops verglichen werden, um Aussagen über das Bindungsverhalten an gemischten glycinergen/ GABAergen Synapsen zu ermöglichen. Die Reinigung des bakteriell exprimierten $\beta 2$ -Loops sollte die Charakterisierung der Bindung mittels weiterer biochemischer Methoden wie Isothermaler-Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie, dynamischer Lichtstreuung und analytischer Gelfiltration ermöglichen.

Aufgrund verschiedener immunzyto- und histochemischer Daten wird eine Interaktion zwischen Gephyrin und dem GABA_AR- $\gamma 2$ -Loop vermutet. Um dies näher zu überprüfen, sollten auch Kosedimentationsanalysen mit den Loops der beiden Spleiß-Varianten – $\gamma 2S$ und $\gamma 2L$ – durchgeführt und diese im Hinblick auf einen möglichen Einfluss der Rezeptor-Phosphorylierung auf die Bindung analysiert werden. Abschließend sollte in HEK293-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie eine zelluläre Charakterisierung der wechselseitigen GABA_AR- α , - β und - γ Interaktion analysiert werden.

2 Ergebnisse

Die Interaktion zwischen Gephyrin und dem Glycin-Rezeptor- β -Loop ist bereits lange bekannt (Kneussel et al., 1999; Pfeiffer et al., 1982) und wurde im Detail studiert (Kim et al., 2006; Schrader et al., 2004; Specht et al., 2011). Zwar zeigten zahlreiche *in vivo* Studien, dass Gephyrin ebenfalls mit GABA_A-Rezeptoren kolokalisiert, jedoch ist vergleichbar wenig über die direkte Interaktion beider Proteine bekannt. Des Weiteren lässt die im Vergleich zum Glycin-Rezeptor hohe Diversität der GABA_A-Rezeptoren eine weitaus komplexere und mehrere Rezeptor-Untereinheiten umfassende Interaktion erwarten. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen eine direkte Interaktion zwischen Gephyrin und den GABA_AR-Untereinheiten α 1 (Mukherjee et al., 2011), α 2 (Tretter et al., 2008) und α 3 (Saiepour et al., 2010). Detaillierte Analysen ergaben, dass es sich – verglichen mit dem GlyR- β -Loop – um eine weitaus schwächere Bindung handelt, die aber über dieselbe Bindungstasche in der Gephyrin-E-Domäne vermittelt wird (Maric et al., 2011). Außerdem konnte schon früher eine schwache Interaktion zwischen der GABA_AR- β 3-Untereinheit und Gephyrin in HEK293-Zellen gezeigt werden (Kirsch et al., 1995). Kosedimentationsanalysen einer weiteren Studie (Smolinsky, 2009) zeigten, dass auch die GABA_AR- β 2- und - β 3-Untereinheiten eine direkte Interaktion zu Gephyrin aufweisen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde im Folgenden die Gephyrin-GABA_A-Rezeptor Interaktion im Detail untersucht.

2.1 Expression und Reinigung verschiedener Gephyrin-Varianten

Für Interaktionsstudien zwischen verschiedenen GABA_AR-Loops und Gephyrin wurden die in *E. coli* rekombinant exprimierten sowie gereinigten Gephyrin-Varianten rC4c und rC4c-P713E (Abb.2.1) verwendet. Es handelt sich hierbei um die Gephyrin Spleiß-Variante rC4c, die sowohl im Gehirn als auch in der Leber exprimiert wird (Paarmann et al., 2006) und sich durch einen zusätzlichen Einschub der Spleißkassette C4c in der C-Domäne auszeichnet (Abb.2.1). Für die Gephyrin-Bindung sowohl an den GlyR- β -Loop (Kim et al., 2006) als auch an die GABA_AR-Loops α 1, α 2 und α 3 (Maric et al., 2011) wurde gezeigt, dass es durch den Aminosäure-Austausch in Gephyrin an Position 713 von Prolin zu Glutamat zu einem vollständigen Verlust der Rezeptor-Gephyrin Interaktion kommt. Um den Effekt dieser Aminosäure auf die Interaktion zwischen Gephyrin und den GABA_AR-Untereinheiten β 2 und β 3 genauer zu untersuchen, wurde diese Variante hier ebenfalls exprimiert und gereinigt.

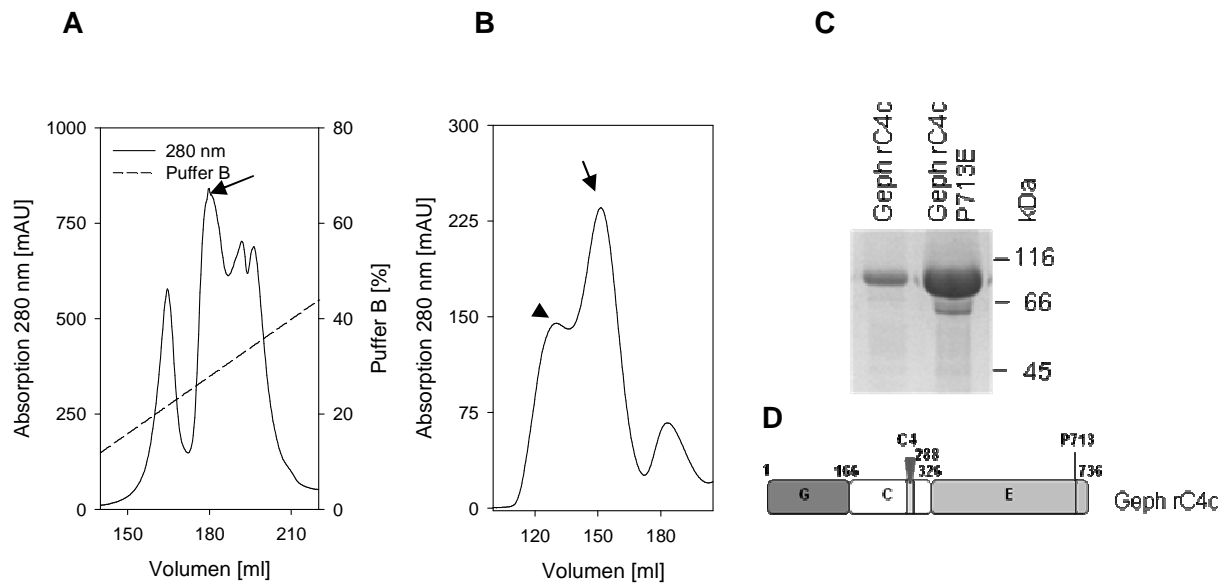


Abb. 2.1: Aufreinigung von rekombinant in *E. coli* exprimierten Gephyrin rC4c-Varianten. (A) Die Elutionsfraktionen einer Ni-NTA-Reinigung wurden zur weiteren Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie eingesetzt, Gephyrin rC4c (Pfeil) eluiert bei 30 % Puffer B (1 M NaCl). (B) Größenausschlusschromatographie zur weiteren Aufreinigung von Gephyrin rC4c. Das Elutionsvolumen von Gephyrin entspricht einem Molekulargewicht von 323 kDa (trimeres Gephyrin, Pfeil) bzw. 637 kDa (hexamerer Gephyrin, Pfeilkopf). (C) Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA Gel zur Kontrolle des Reinheitsgrades der verschiedenen aufgereinigten Gephyrin-Varianten. (D) Schematische Darstellung der verwendeten Gephyrin-Variante.

Alle verwendeten Gephyrin-Varianten wurden in *E. coli* BL21-Zellen mit N-terminalem His₆-tag exprimiert. Die Reinigung ist exemplarisch für Gephyrin rC4c in Abbildung 2.1 dargestellt, entsprach aber für alle Varianten demselben Protokoll. Nach Ernte und Zellaufschluss wurde der lösliche Überstand mittels Ni-NTA-Matrix aufgereinigt und die daraus resultierende Elution einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Die sequentielle Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen Salzgradienten und somit über die Erhöhung der Ionenstärke, wobei Gephyrin typischerweise bei 30 % Puffer B (1 M NaCl) eluierte, was einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl entsprach (Abb.2.1 A). Da die Gephyrin-Varianten nach diesem Schritt bereits eine hohe Reinheit aufwiesen (Abb.2.1 C), konnten sie für die meisten Experimente eingesetzt werden. Lediglich für analytische Gelfiltrationsläufe wurde eine weitere Reinigung über eine präparative Gelfiltrationssäule (Superdex 16/60 200, 320 ml SV) durchgeführt.

Da die gereinigte Gephyrin E-Domäne in Lösung dimerisiert (Kim et al., 2006), während die G-Domäne trimerisiert (Schwarz et al., 2001), wird vermutet, dass holo-Gephyrin als funktionelles Trimer vorliegt. Die Größenausschlusschromatographie diente dazu, trimeres Gephyrin von höher oligomerisiertem Gephyrin sowie weiteren Verunreinigungen zu trennen

(Abb.2.1 B). Die Säule wurde zuvor mit Standardproteinen kalibriert, woraus sich ein Molekulargewicht von 323 kDa für einen trimeren Gephyrin-Komplex, der nach 151 ml eluierte, ergab. Hexameres Gephyrin (637 kDa) eluierte bei 130 ml, während der nach 185 ml eluierende Peak Verunreinigungen entspricht, die nach der Anionenaustauschchromatographie noch in den Gephyrin-Proben vorhanden waren und somit hier separiert werden konnten.

2.2 Charakterisierung der direkten Interaktion zwischen Gephyrin und der GABA_AR-β2-Untereinheit

2.2.1 Erzeugung und Expression GST-fusionierter GABA_AR-Loops

Wie von Smolinsky (2009) beschrieben, wurden die verschiedenen GABA_AR-Loops α1, α2, β2, β3, γ2S und γ2L in den pGEX-6P-1-Vektor kloniert, um eine spezifische Aufreinigung bzw. Kosedimentationsanalysen mittels Glutathion-Sepharose-Matrix zu ermöglichen. Dabei wurde cDNA aus Rückenmark sowie Kleinhirn von *Mus musculus* verwendet (Smolinsky, 2009). Im verwendeten Vektor ist zwischen der N-terminal fusionierten Glutathion-S-Transferase (GST) und der zu exprimierenden GABA_AR-Untereinheit eine *PreScission*-Protease-Schnittstelle kloniert. Dies ermöglicht sowohl die Aufreinigung eines GST-fusionierten als auch eines isolierten Proteins.

Die Auswahl der Untereinheiten erfolgte auf Basis verschiedener veröffentlichter Daten. Zum einen besteht der größte Teil der an der neuronalen Oberfläche exponierten und synaptisch lokalisierten GABA_ARs aus zwei α-, zwei β- und einer γ-Untereinheit (Jacob et al., 2008; Rudolph und Mohler, 2004), wobei der Subtyp bestehend aus zwei α1-, zwei β2- und einer γ2-Untereinheit am häufigsten vertreten ist (Pirker et al., 2000). Des Weiteren ist bekannt, dass die γ2-Untereinheit für eine synaptische Lokalisation des pentameren Rezeptors notwendig ist (Essrich et al., 1998) und eine verstärkte Interaktion mit Gephyrin aufweist (Essrich et al., 1998; Kneussel et al., 1999). Außerdem wurde eine Kolo-kalisation der GABA_AR-β3-Untereinheit mit aggregiertem Gephyrin in HEK293-Zellen gezeigt (Kirsch und Betz, 1995). Die α2-Untereinheit wurde neben dem GlyR-β-Loop als Positivkontrolle eingesetzt, da dies zu Beginn der Studien die einzige GABA_AR-Untereinheit war, für die eine direkte Interaktion mit Gephyrin nachgewiesen war (Tretter et al., 2008).

Zur Ermittlung der genauen cytoplasmatischen Sequenz zwischen den Transmembrandomänen drei und vier der einzelnen Rezeptor-Untereinheiten wurde der TMHMM-2.0 Server (*transmembrane hidden markov model*; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) genutzt

(vgl. auch Smolinsky 2009). Dieser ermittelt anhand der Aminosäuresequenz des Gesamtproteins dessen Topologie und lässt somit Rückschlüsse bezüglich hydrophober, transmembranständiger sowie hydrophiler und somit cytoplasmatischer bzw. extrazellulärer Bereiche zu. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte unter Ausschluss des N-terminalen Signalpeptids (ermittelt durch SignalP 4.0 Server), welches für die Translation am rauhen ER essentiell ist und während des Reifungsprozesses abgespalten wird. Die cytoplasmatischen Loops umfassten 83-125 Aminosäuren und entsprachen somit ca. 22,5 % des Gesamtproteins. Die verwendeten Sequenzen sind Tabelle 2.1 zu entnehmen, wobei die gesamte Sequenz der verschiedenen Untereinheiten im Anhang aufgelistet ist (vgl.5.3.1).

Die Expression der GST-fusionierten Rezeptor-Loops erfolgte in kompetenten Zellen des *E. coli* Bakterienstammes ER2566, da in diesem die Gene für *ion* und *OmpT*, welche für Proteasen kodieren, deletiert sind (Tabelle 4.1), was dem Abbau von rekombinant exprimierten Proteinen entgegenwirken soll.

Tabelle 2.1: Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen GABA_AR-Loops aus *M. musculus* im pGEX-6P-1-Vektor.

Loop	Reste	Aminosäuresequenz	Anteil am Gesamtprotein
GABA _A R-α1	310-392	TKRGYAWDVGKSVVPEKPKKVKDPLIKKNNTYAPTATSYTPNLAR GDPGLATIAKSATIEPKEVKPETKPPEPKKTFNSVSKID	19,4 %
GABA _A R-α2	310-394	TKRGWAWDVGKSVVNDKKKEKGSVMIQNAYAVAVANYAPNLS KDPVLTISKSATTPEPNKKPENKPAEAKKTFNSVSKIDRMSR	20,1 %
GABA _A R-β2	306-430	FFGRGPQRQKKAEEKAANANNEKMRDLDVNMKDPHENILLSTLEI KNEMATSEAVMGLGDPRTMLAYDASSIQYRKAGLPRHSFGRN ALERHVAQKKSRLRRRASQLKITIPDLTDVNAIDRWSR	27,8 %
GABA _A R-β3	306-428	FFGRGPQRQKLAEKTAKAKNDRSKSEINRVDAGNILLAPMDV HNEMNEVAGSVGDTRNSAISFDNSGIYRKQSMPKEGHGRYM GDRSIPHKKTHLRRRSSQLKIKIPDLTDVNAIDRWSR	27,5 %
GABA _A R-γ2S	321-403	VSNRKPSKDKDKKKKNPAPTIDIRPRSATIQMNNATHLQERDEE YGYECLDGKDCASFFCCFEDCRTGAWRHGRIHIRIAKMD	19,4 %
GABA _A R-γ2L	321-411	VSNRKPSKDKDKKKKNPLLRMFSPKAPTIDIRPRSATIQMNNATH LQERDEEYGYECLDGKDCASFFCCFEDCRTGW RHGRIHIRIAKMD	20,7 %

2.2.2 Kosedimentation von Gephyrin mit GST-fusionierten GABA_AR-Loop-Konstrukten

Für Kosedimentationsanalysen mussten zunächst Rezeptor-Loop-*beads* hergestellt werden, indem die exprimierten Proteine an Glutathion-Sepharose immobilisiert wurden (vgl.4.3.7.1).

Je nach Saturierung der *beads* mit den verschiedenen Rezeptor-Loops wurden diese in unterschiedlichen Mengen (10-25 μ l effektive *beads*) mit Hirn-Rohextrakt bzw. rekombinantem Gephyrin rC4c-P713E für 30 min bei RT unter leichtem Rütteln koinkubiert. Hirnextrakt wurde verwendet, um eine Interaktion mit nativem Gephyrin zu überprüfen, wobei rekombinantes Gephyrin Aufschluss über eine direkte Interaktion geben sollte. Eine Inkubation über 30 min hinaus war – vor allem bei Inkubation mit Hirnextrakt – nachteilig, da es durch die im Hirnextrakt enthaltenen Proteasen verstärkt zur Degradation der Rezeptor-Loops kam. Da diese besonders bei höheren Temperaturen aktiv sind, wurden testweise auch Kosedimentationen bei 4 °C durchgeführt. Um eine geringere Bindungsintensität aufgrund der geringen Temperaturen zu umgehen, wurde dabei die Inkubationszeit verlängert. Dies führte zwar auch zu reproduzierbaren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt), allerdings wurde die Inkubation bei RT bevorzugt, da dies physiologische Bedingungen von 37 °C eher widerspiegelt. Die Degradation der Rezeptor-Loop-*beads* war ein generelles Problem, konnte jedoch trotz Zugabe von Protease-Inhibitor sowie schnellen Arbeitens bei 4 °C nicht verhindert werden. Alle Kosedimentationsanalysen wurden mehrfach durchgeführt und führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass GABA_AR- α 2 als Positivkontrolle sowie der - β 2 und - β 3-Loop deutlich in der Lage waren, natives Gephyrin aus dem Hirnextrakt zu sedimentieren (Abb.2.2 A). Da die GABA_AR- β 2-Loop *beads* eine schlechtere Qualität aufwiesen, schien die Bindung schwächer zu sein als für den β 3-Loop. Für eine quantitative Aussage bezüglich der Bindungsaffinitäten sind allerdings weitere biophysikalische Analysen notwendig. Eine deutlich schwächere Bindung von Gephyrin an den GABA_AR- α 1-Loop konnte ebenfalls gezeigt werden. Eine Interaktion von Gephyrin mit der Negativkontrolle GST war nicht zu verzeichnen.

Insbesondere für die beobachtete Bindung der GABA_AR- β 2- und - β 3-Loops wurde eine mögliche Überlappung der Bindestelle innerhalb des Gephyrins mit der des GlyR- β -Loops überprüft. Kosedimentationsanalysen mit der gereinigten Gephyrin rC4c-P713E-Variante (Verlust der GlyR- β -Loop Interaktion; vgl. 2.1) zeigten keine Anreicherung des Gephyrins durch die verwendeten Rezeptor-Loops (GABA_AR- α 1, - α 2, - β 2, - β 3 sowie GlyR- β), was auf fehlende Interaktion zurückzuführen ist. Wie in Abbildung 2.2 B zu sehen, ist die Saturierung der *beads* für alle Rezeptor-Loops in etwa vergleichbar, wobei unterschiedlich viel Degradation zu verzeichnen ist. Des Weiteren zeigt die Überstand-Kontrolle, dass in allen Ansätzen gleiche Mengen der Gephyrin-Variante eingesetzt wurden.

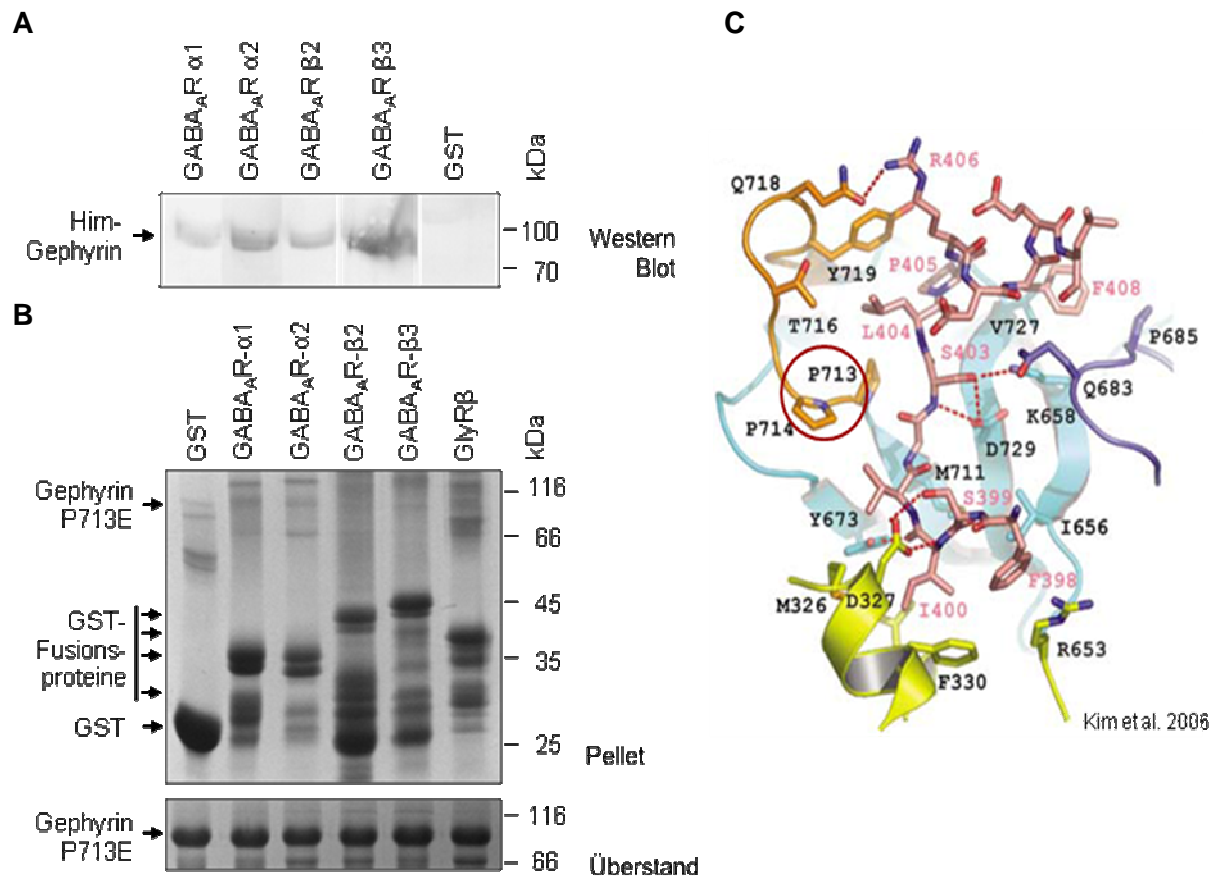


Abb. 2.2: Kosedimentation von Gephyrin mit GST-fusionierten GABA_AR-Loops. (A, B) Kosedimentation von (A) Gephyrin aus Hirn-Rohextrakt (200 µg) und (B) gereinigter Gephyrin rC4c-P713E-Variante (450 pmol) mit GST-fusionierten GABA_AR-α1-, -α2-, -β2- und -β3-Loops. Gebundene (Pellet) und ungebundene (Überstand) Proteinfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und für Coomassie-Färbung (B) oder Western Blot-Analysen unter Verwendung eines monoklonalen Gephyrin-Antikörpers (Smolinsky et al., 2008) (A) genutzt. (C) Kristallstruktur der Gephyrin-E Domäne im Komplex mit gebundenem GlyR-β-Loop (Reste 378-426). Die für die Interaktion wichtigen Aminosäuren sind dargestellt. Hervorzuheben ist Prolin713 (roter Kreis), durch dessen Austausch zu Glutamat die Bindung zwischen Gephyrin und dem Glycin-Rezeptor-Loop zerstört wird (Kim et al., 2006).

2.2.3 Kosedimentation von Gephyrin-Spleiß-Varianten mit GST-fusioniertem GABA_AR-β2-Loop

Während der Kosedimentationsanalysen mit den verschiedenen GABA_AR-Untereinheiten und Hirnextrakt war auffällig, dass in der Western-Blot-Analyse teilweise mehrere eng beieinander liegende Gephyrin-Banden spezifisch durch den Gephyrin-Antikörper detektiert wurden. Dies lässt vermuten, dass es sich dabei um verschiedene Spleiß-Varianten des Gephyrins handelte. Zur weiteren Charakterisierung der Bindung zwischen der GABA_AR-β2-Untereinheit und Gephyrin wurde daher eine mögliche Spleiß-spezifische Bindung untersucht. Dazu wurden die Spleiß-Varianten Geph, Geph-C3 sowie Geph-C4c (Abb.2.3 B)

als GFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert und der Zell-Rohextrakt für Kosedimentationsanalysen verwendet. Diese ergaben, dass sowohl der GlyR- β als auch der GABA_AR- β 2-Loop in der Lage waren, alle untersuchten Gephyrin-Spleiß-Varianten zu sedimentieren (Abb.2.3 A).

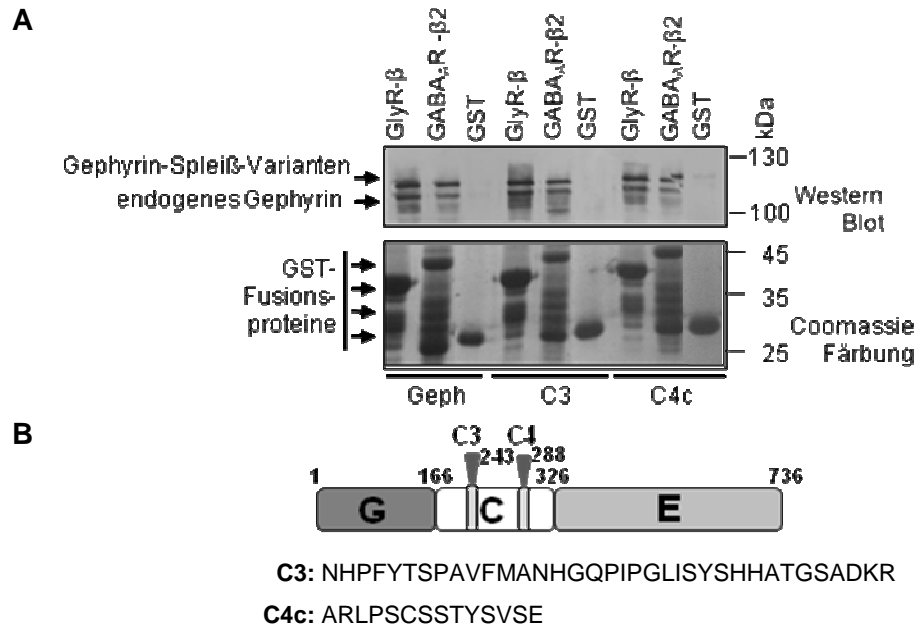


Abb.2.3: Kosedimentation verschiedener Gephyrin-Spleiß-Varianten mit GST-fusionierten GABA_AR- β 2-Loops. (A) Kosedimentation verschiedener GFP-fusionierter Gephyrin-Spleiß-Varianten aus HEK293-Zellen (500 μ g) mit GST-fusioniertem GABA_AR- β ₂₃₀₆₋₄₃₀ und GlyR- β -Loop. (B) Schematische Darstellung von Gephyrin. Geph entspricht dem Protein ohne zusätzliche Spleiß-Kassette in der C-Domäne. Die Position sowie Sequenz der C3- und C4c-Variante ist dargestellt.

Auch eine Bindung an endogenes Gephyrin war nachweisbar, womit zuvor gezeigte Ergebnisse bestätigt werden konnten (Abb.2.2). Da es sich bei den Spleiß-Varianten ausschließlich um Insertionen in der C-Domäne handelt, beeinflussen Unterschiede in dieser Domäne die Interaktion mit den Rezeptor-Loops nicht signifikant. Allerdings können mittels Kosedimentation – aufgrund von Schwankungen in der Saturierung der eingesetzten *beads* sowie Degradation – keine exakten Aussagen über unterschiedliche Bindungsaffinitäten der verschiedenen Spleiß-Varianten zum Rezeptor-Loop gemacht werden. Um dies zu ermöglichen, müssten weitere biochemische Analysen durchgeführt werden.

2.2.4 Eingrenzung der Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA_AR- β 2-Loop

Nachdem die direkte Interaktion zwischen Gephyrin und dem GABA_AR- β 2-Loop gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt das Gephyrin-Bindungsmotiv auf dem Loop weiter

eingegrenzt. Die $\beta 2$ -Untereinheit ist Teil des am häufigsten im Gehirn vorkommenden GABA_AR-Subtyps ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$) (Pirker et al., 2000). Daher wurde hier das Augenmerk auf diese Untereinheit gelegt und die Gephyrin-Interaktion mit dem GABA_AR- $\beta 3$ -Loop, welche ebenfalls hier gezeigt werden konnte, in späteren Versuchen eingehender betrachtet.

Tabelle 2.2: Aminosäuresequenzen der trunkierten GABA_AR- $\beta 2$ -Loops zur Eingrenzung des Gephyrin-Bindemotivs.

GABA _A R- $\beta 2$ -Loop	Aminosäuresequenz	MW [kDa] der GST-Fusion ¹
GABA _A R- $\beta 2_{306-430}$ (kompletter Loop)	FFGRGPQRQKKA AEKAANANNEKMRLDVNKMDPHENILLSTLEIKNE MATSEAVMGLGDPRSTMLAYDASSIQYRKAGLPRHSFGRNALERHV AQKKSRLRRRASQLKITIPDLTDVNAIDRWSR	44,5
GABA _A R- $\beta 2_{306-400}$	FFGRGPQRQKKA AEKAANANNEKMRLDVNKMDPHENILLSTLEIKNE MATSEAVMGLGDPRSTMLAYDASSIQYRKAGLPRHSFGRNALERHV AQ	37,8
GABA _A R- $\beta 2_{320-430}$	KAANANNEKMRLDVNKMDPHENILLSTLEIKNEMATSEAVMGLGDPR STMLAYDASSIQYRKAGLPRHSFGRNALERHVAQKKSRLRRRASQLK ITIPDLTDVNAIDRWSR	40,9
GABA _A R- $\beta 2_{337-388}$	DPHENILLSTLEIKNEMATSEAVMGLGDPRSTMLAYDASSIQYRKAGL PRHS	32,5
GABA _A R- $\beta 2_{337-420}$	DPHENILLSTLEIKNEMATSEAVMGLGDPRSTMLAYDASSIQYRKAGL PRHSFGRNALERHVAQKKSRLRRRASQLKITIPDLT	36,3
GABA _A R- $\beta 2_{337-430}$	DPHENILLSTLEIKNEMATSEAVMGLGDPRSTMLAYDASSIQYRKAGL PRHSFGRNALERHVAQKKSRLRRRASQLKITIPDLTDVNAIDRWSR	37,5
GABA _A R- $\beta 2_{361-400}$	GLGDPRSTMLAYDASSIQYRKAGLPRHSFGRNALERHVAQ	31,6
GABA _A R- $\beta 2_{390-430}$	GRNALERHVAQKKSRLRRRASQLKITIPDLTDVNAIDRWSR	31,7
GABA _A R- $\beta 2_{390-408}$	GRNALERHVAQKKSRLRRR	29,0
GABA _A R- $\beta 2_{396-420}$	ERHVAQKKSRLRRRASQLKITIPDLT	29,9
GABA _A R- $\beta 2_{390-420}$	GRNALERHVAQKKSRLRRRASQLKITIPDLT	30,4

¹ MW = Molekulargewicht

Es wurden verschieden trunkierte Varianten des GABA_AR- $\beta 2$ -Loops (Tabelle 2.2) in den pGEX-6P-1-Vektor kloniert. Die Klonierungsstrategie wurde so gewählt, dass eine möglichst geringe Anzahl zusätzlicher Aminosäuren in das resultierende Peptid eingebaut werden. Insbesondere bei den sehr kurzen Loop-Fragmenten könnte dies ansonsten zur Beeinflussung der Interaktion kommen und somit das Ergebnis verfälschen. Eine schematische Übersicht zur Einordnung der trunkierten Varianten innerhalb des Gesamt-Loops ist Abbildung 2.4 A zu entnehmen.

Die erstellten GABA_AR-β2-Loop-Varianten wurden analog zu Kapitel 2.2.1 als GST-Fusionsproteine exprimiert und zur Erstellung von Glutathion-Sepharose-*beads* eingesetzt. Diese wurden für Kosedimentationsanalysen mit Hirn-Rohextrakt (Abb.2.4 B) oder rekombinatem Gephyrin rC4c (Abb.2.4 C) verwendet. Der spezifische Nachweis von gebundenem Gephyrin wurde mittels Western Blot-Analyse durchgeführt. Des Weiteren wurden alle Elutionsproben zusätzlich im Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel analysiert, um die Qualität sowie Saturierung der eingesetzten GST-Rezeptor-Loop *beads* zu überprüfen. Wie in Abbildung 2.4 B und C zu sehen, waren alle *beads* stark beladen und entsprachen dem erwarteten Molekulargewicht (Tabelle 2.2), wiesen aber Unterschiede im Grad der Degradation auf. Als Positivkontrolle wurden mit dem GST-GlyR-β-Loop sowie als Negativkontrolle GST-beladene *beads* eingesetzt. In beiden Ansätzen – mit Hirnextrakt und rekombinatem Gephyrin – sedimentierten die verkürzten GABA_AR-β2-Loop-Fragmente, die den C-terminalen Teil des Loops umfassten, Gephyrin in hohem Maße. Dies war vergleichbar mit der Gephyrin-Bindung an den kompletten Loop (GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀) oder den GlyR-β-Loop, wobei die Bindung an den GlyR-β-Loop am stärksten war (Abb.2.4 B). Die übrigen verkürzten Loop-Sequenzen waren dagegen nicht in der Lage, Gephyrin zu binden. Alle schwachen Signale waren mit der GST-Kontrolle vergleichbar und wurden somit als unspezifisch eingestuft. Die stärkste Gephyrin-Interaktion wurde jedoch für ein Fragment beobachtet, das die Aminosäuren 390-430 umfasst. Daher wurden drei kleinere Fragmente dieser Peptid-Region erstellt und ebenfalls Kosedimentationsanalysen unterzogen (Abb.2.4 C). Diese zeigten, dass alle trunkierten Varianten des Bereichs 390-430 noch in der Lage waren, Gephyrin zu binden. Eine Betrachtung der überlappenden Bereiche ermöglicht somit die Eingrenzung des minimalen Gephyrin-Bindebereichs auf die Aminosäuren 396-408. Allerdings wies die GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Variante mit Abstand die stärkste Gephyrin-Bindung auf. Dies lässt vermuten, dass dieses Peptid alle nötigen Aminosäuren für eine starke und effiziente Bindung des Rezeptor-Loops an Gephyrin enthält. Innerhalb des identifizierten β2-Peptids (Reste 390-420) liegt ein Clathrin-Adapterprotein-2- (AP2-) Bindungsmotiv (Kittler et al., 2005) sowie eine Phosphorylierungsstelle am Serin 410 (zusammengefasst in Luscher et al., 2011), was auf eine regulatorische Funktion hindeutet.

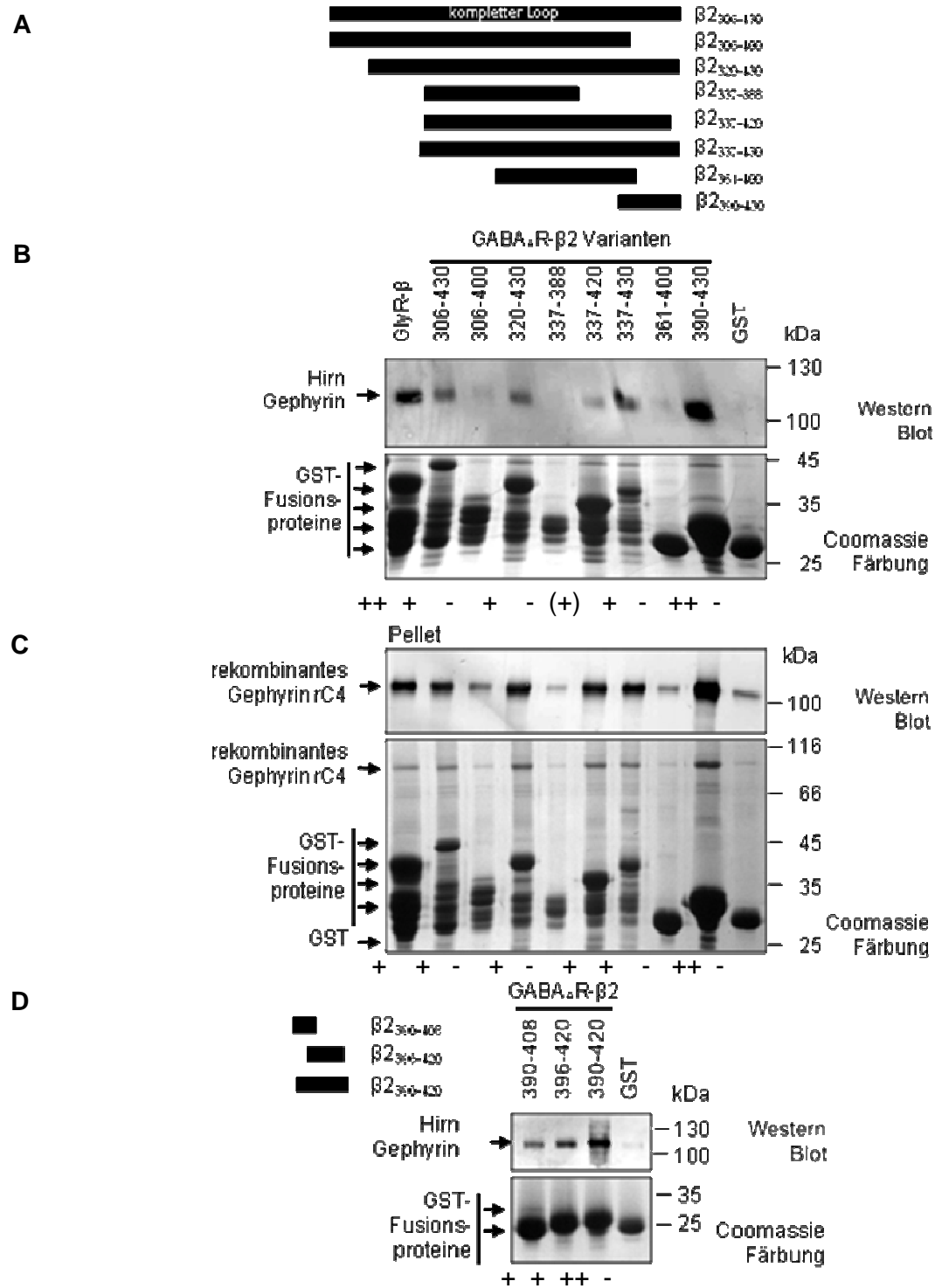


Abb. 2.4: Identifizierung der Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA_AR-β2-Loop. (A) Schematische Übersicht aller verwendeten GABA_AR-β2-Loop Konstrukte zur Eingrenzung der Gephyrin-Bindestelle. (B, C) Kosedimentation von Gephyrin mit GST-fusionierten GABA_AR-β2-Loop-Fragmenten aus Hirn-Rohextrakt (B, 400 µg) und gereinigtem Gephyrin rC4c (C, 500 pmol). Als Positivkontrolle wurde GST-fusionierter GlyR-β-Loop und als Negativkontrolle GST-gekoppelte *beads* verwendet. (D) Der Vergleich verschiedener GABA_AR-β2-Loop-Fragmente in der potentiellen Binderegion zeigt eine Bindung aller getesteten Fragmente an Gephyrin. Die Stärke der Bindung des jeweiligen Loop-Fragmentes an Gephyrin ist durch „+“ symbolisiert. „-“ steht für keine Bindung des Loop-Fragmentes an Gephyrin.

2.2.5 Überprüfung der phosphorylierungs-abhängigen Bindung von Gephyrin an den GABA_AR-β2-Loop

Die Phosphorylierung der Serine 408 und 409 reduziert die Bindung der GABA_AR-β3-Untereinheit an die μ2-Untereinheit des AP2-Komplexes, was in einer verminderten Internalisierung von GABA_A-Rezeptoren resultiert (Kittler et al., 2005). Eine Bindung der AP2-μ2-Untereinheit an die GABA_AR-β2-Untereinheit konnte ebenfalls gezeigt werden (Kittler et al., 2005) ebenso wie die Phosphorylierung des korrespondierenden Serin 410-Restes innerhalb der AP2-Bindestelle (Abb.2.5 A; zusammengefasst in Luscher et al., 2011). Vermutlich wird die Internalisierung der β2-Untereinheit auf dieselbe Art und Weise reguliert, wie es bereits für die β3-Untereinheit gezeigt wurde. Da Gephyrin GABA_A-Rezeptoren an der Synapse clustert und somit der Endozytose der Rezeptoren entgegenwirkt, stellt sich die Frage, ob die spezifische Phosphorylierung des GABA_AR-Loops möglicherweise die Bindung beider Proteine reguliert.

2.2.5.1 Kosedimentation von Gephyrin mit einer phosphomimetischen GABA_AR-β2-Loop-Variante

Zunächst wurde eine phosphomimetische (S410D) sowie eine phosphodefiziente (S410A) Variante des GABA_AR-β₂³⁰⁶⁻⁴³⁰-Loops generiert. Hierbei simuliert die negative Ladung des Aspartats eine Phosphorylierung an Position 410, wohingegen das Einfügen eines Alanins durch seine kleine, ungeladene Struktur unphosphoryliertes Protein widerspiegelt. Kosedimentationsanalysen mit Hirn-Gephyrin und gereinigtem Gephyrin rC4c zeigten, dass Wildtyp- sowie S410A-Loop-Variante nahezu gleichermaßen in der Lage waren, Gephyrin zu binden, wohingegen die GABA_AR-β2-S410D-Loop-Variante eine signifikant erhöhte Interaktion mit Gephyrin aufwies. Es ist jedoch zu beachten, dass leichte Schwankungen in der Saturierung der eingesetzten *beads* vorlagen. Mit Hirnextrakt koinkubierte *beads* (Abb.2.5 B) zeigten die stärkste Saturierung für die S410A Variante, wohingegen kein Unterschied in der Saturierung zwischen Wildtyp und S410D-Variante erkennbar war. Dies unterstreicht zusätzlich die oben geschilderte Beobachtung, da die S410A-Variante trotz erhöhter Menge eingesetzter *beads* die schwächste Bindung an Gephyrin aufwies. Für die Kosedimentations-analyse mit gereinigtem Gephyrin rC4c (Abb.2.5 C) war dagegen eine ausgeglichene Saturierung der beiden Varianten (S410A und D) zu verzeichnen, wodurch ein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich war. Dagegen ist in diesem Ansatz die Saturierung der WT-*beads* relativ schwach, was sich in der Stärke der sedimentierten Gephyrin-Bande widerspiegelt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die phosphomimetische GABA_AR-β2 S410D-Variante in der Lage war, sowohl rekombinantes als auch natives Gephyrin am stärksten zu sedimentieren. Dieses Ergebnis weist auf einen möglichen phosphorylierungs-abhängigen Mechanismus hin, der eine inverse Regulation der Internalisierung sowie postsynaptischen Clusterung von GABA_ARs ermöglichen könnte.

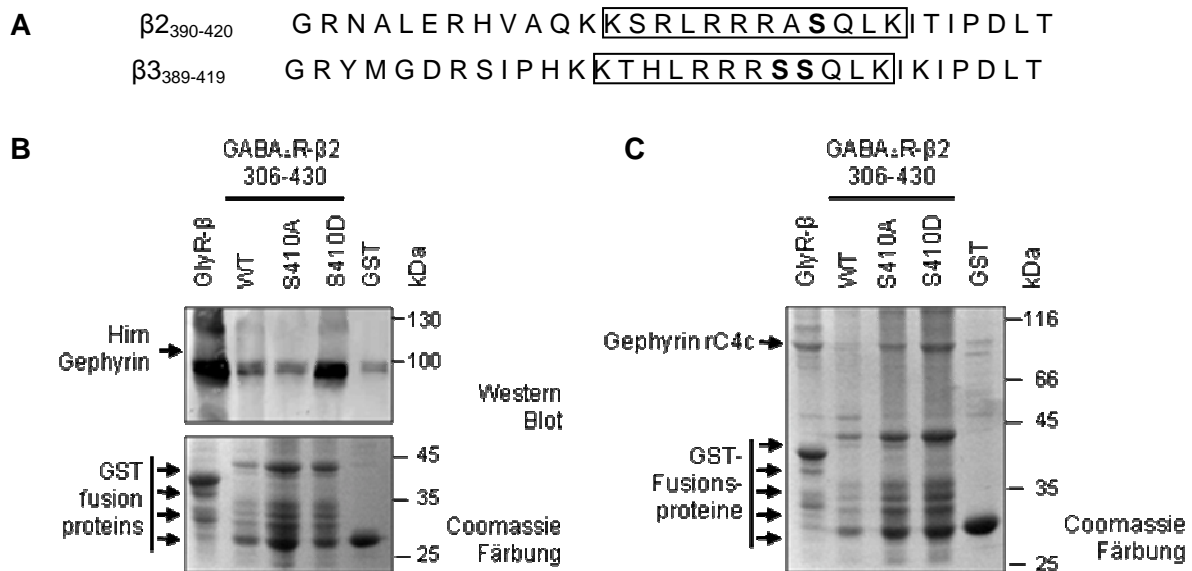


Abb. 2.5: Untersuchung eines möglichen Einflusses von phosphoryliertem Serin 410 auf die Gephyrin-GABA_AR-β2-Loop Interaktion. (A) Aminosäuresequenz der Gephyrin-Binderegion der GABA_AR-β2-Untereinheit sowie die dazu homologe Sequenz der β3-Untereinheit. Das AP2-Bindemotiv (Kittler et al., 2005) ist durch eine Box hervorgehoben; die Serin-Phosphorylierungsstellen (zusammengefasst in Luscher et al., 2011) sind fett dargestellt. (B, C) Kosedimentation von Gephyrin mit GABA_AR-β2₃₀₆₋₄₃₀-Loop-Varianten aus Hirn-Rohextrakt (B) und mit rekombinatem Gephyrin rC4c aus *E. coli* (C).

2.2.5.2 *In vitro* Phosphorylierungsanalyse

Die Kosedimentationsanalysen mit dem phosphomimetischen GABA_AR-β2-Loop lieferten einen ersten Hinweis auf einen möglichen Einfluss des Serins 410 auf die GABA_AR-β2-Gephyrin Interaktion. Für eine zusätzliche Analyse wurden *in vitro* Phosphorylierungen durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über einen möglichen phosphorylierungs-abhängigen Effekt auf die GABA_AR-β2-Gephyrin Interaktion zu erhalten. Dazu wurden erneut *beads* der drei GABA_AR-β2-Loop-Varianten – WT, S410A und S410D – erstellt und für Kosedimentationsanalysen mit Hirnextrakt eingesetzt (Abb.2.6). Um eine Phosphorylierung der Loops zu ermöglichen, wurde zusätzlich zum Hirnextrakt ATP im Überschuss sowie Magnesium-Ionen als Cosubstrat hinzugefügt. Dies sollte die Aktivität der im Hirnextrakt enthaltenen nativen Kinasen steigern und somit zur Phosphorylierung der entsprechenden Motive an den gekoppelten Rezeptor-Loops führen. Um im direkten Vergleich den Effekt des

ATPs zu verdeutlichen, wurde das Experiment in zwei Ansätzen – mit und ohne Zugabe von zusätzlichem ATP – durchgeführt.

Zu erwarten war eine erhöhte Bindung des Gephyrins an den unmodifizierten GABA_AR-β2₃₀₆₋₄₃₀-Loop. Dieser sollte durch das zusätzliche ATP und die im Hirnextrakt enthaltenen Kinasen im Ansatz an Position 410 phosphoryliert werden und somit Gephyrin stärker binden. Die Bindungsintensität sollte vergleichbar mit der S410D-Variante oder fester sein, da diese die entsprechende Phosphorylierung simuliert. Für die S410A-Variante wäre dagegen weiterhin in beiden Ansätzen eine vergleichbar schwächere Bindung als die S410D-Variante zu erwarten. Als Positivkontrolle wurden *beads* des GlyR-β-Loops eingesetzt. Für diesen ist bekannt, dass die Phosphorylierung des Serins 403 die Bindungsaffinität zu Gephyrin reduziert (Specht et al., 2011), was eine Überprüfung des Versuchsansatzes ermöglicht.

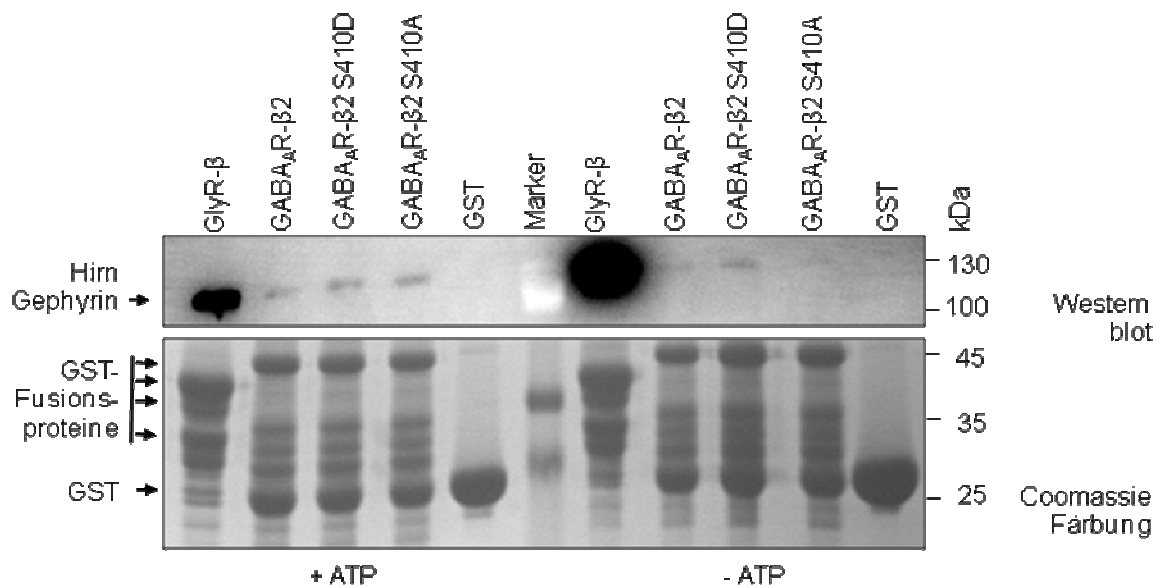


Abb. 2.6: *In vitro* Phosphorylierung von GABA_AR-β2-Loop-Varianten mit ATP und Hirn-Rohextrakt. Kosedimentation von Gephyrin aus Hirn-Rohextrakt mit den GST-fusionierten GABA_AR-β2₃₀₆₋₄₃₀-Loop-Varianten WT, S410A und S410D. Um eine mögliche Phosphorylierungs-abhängige Bindung identifizieren zu können, wurden doppelte Ansätze vorbereitet, wobei einer zusätzliches ATP (+ ATP) enthielt.

Wie erwartet war mit ATP eine abgeschwächte Gephyrin-Bindung an den potentiell phosphorylierten GlyR-β-Loop zu verzeichnen (Abb. 2.6). Die Ergebnisse für den GABA_AR-β2-Loop sind dagegen nicht eindeutig. Die drei eingesetzten Varianten sedimentieren Gephyrin aus dem Hirn-Rohextrakt mit zusätzlichem ATP gleichermaßen. Dagegen ist im Ansatz ohne ATP eine zu den ATP-Ansätzen vergleichbar starke Bindung an die S410D-Variante erkennbar. Der unmodifizierte Loop sedimentiert Gephyrin nur sehr schwach, wohingegen keine Bindung an die S410A-Variante ersichtlich ist. GST zeigt in beiden

Ansätzen keinerlei Bindung an Gephyrin und hat somit keine negativen Auswirkungen auf die gezeigten Ergebnisse. Das Coomassie-gefärbte SDS-PA-Gel zeigt, dass die Beladung der eingesetzten Rezeptor-Loop-*beads* nahezu identisch ist und somit ein direkter Vergleich der Intensität der Gephyrin-Banden untereinander möglich ist.

Basierend auf den in Abbildung 2.6 gezeigten Daten lässt sich ein phosphorylierungsabhängiger Effekt auf die Bindung zwischen Gephyrin und dem GABA_AR-β2-Loop vermuten, da eine verstärkte Gephyrin-Präzipitation im Ansatz mit zugefügtem ATP messbar war. Allerdings ist aufgrund dessen, dass die S410A-Variante ebenfalls eine stärkere Gephyrin-Bindung aufwies, fraglich, ob die Interaktion durch das Serin 410 oder eine andere Phosphorylierungsstelle im Loop beeinflusst wird.

Es ist bekannt, dass das Serin 410 unter anderem durch die Protein Kinase C (PKC) phosphoryliert wird (zusammengefasst in Luscher et al., 2011). Daher sollten gereinigte PKC-β1, -δ und -γ Isoformen für *in vitro* Phosphorylierungs-Analysen verwendet werden. Hierzu wurde den Herstellerangaben entsprechend ein Phosphorylierungspuffer jeweils mit und ohne Kinase angesetzt und mit den Rezeptor-Loop-*beads* 30 min bei RT vorinkubiert, um eine Phosphorylierung des Loops zu ermöglichen. Anschließend wurden die *beads* mit Pulldown-Puffer gewaschen und für Kosedimentationsanalysen mit rekombinantem sowie nativem Gephyrin eingesetzt. Trotz mehrfacher Durchführung konnte hierbei kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Somit sind keine weiteren Aussagen anhand der durchgeführten Kosedimentationsanalysen bezüglich des Einflusses von Serin 410 auf die Gephyrin-Bindung möglich.

2.2.6 Vergleich der Gephyrin-Interaktion zwischen dem GABA_AR-β2- und -β3-Loop

Wie in Smolinsky (2009) und Abbildung 2.2 gezeigt, binden sowohl der GABA_AR-β2 als auch -β3 intrazelluläre Loop an Gephyrin. Für den GABA_AR-β2-Loop konnte das minimale Bindemotiv für Gephyrin auf die Aminosäuren 396-408 eingegrenzt werden (Abb.2.4). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie beider Rezeptor-Untereinheiten in dieser Region (Abb.2.5 A) lag die Vermutung nahe, dass Gephyrin an die β3-Untereinheit ebenfalls in dieser Region bindet. Dazu wurde analog zu GST-GABA_AR-β2₃₉₀₋₄₀₈ das entsprechende Konstrukt für die β3-Untereinheit (GST-GABA_AR-β3₃₈₉₋₄₀₇) erstellt. Mit den entsprechenden GST-fusionierten Proteinen beladene *beads* wurden für Kosedimentationsanalysen genutzt (Abb.2.7). Diese zeigten, dass beide Loop-Fragmente in der Lage waren, Gephyrin spezifisch zu binden und zu sedimentieren. Trotz gleichmäßiger Beladung der Rezeptor-Loop-*beads* schien die Interaktion von Gephyrin mit der β2-Untereinheit wesentlich stärker

zu sein. Quantitative Aussagen darüber können jedoch nur anhand weiterer biochemischer Analysen gemacht werden, da Kosedimentationsanalysen aufgrund ihrer Variabilität nur Hinweise geben können. Somit bindet Gephyrin sowohl an die GABA_AR-β2- als auch die -β3-Untereinheit an einen homologen Bereich am C-Terminus des intrazellulären Loops zwischen Transmembrandomänen drei und vier.

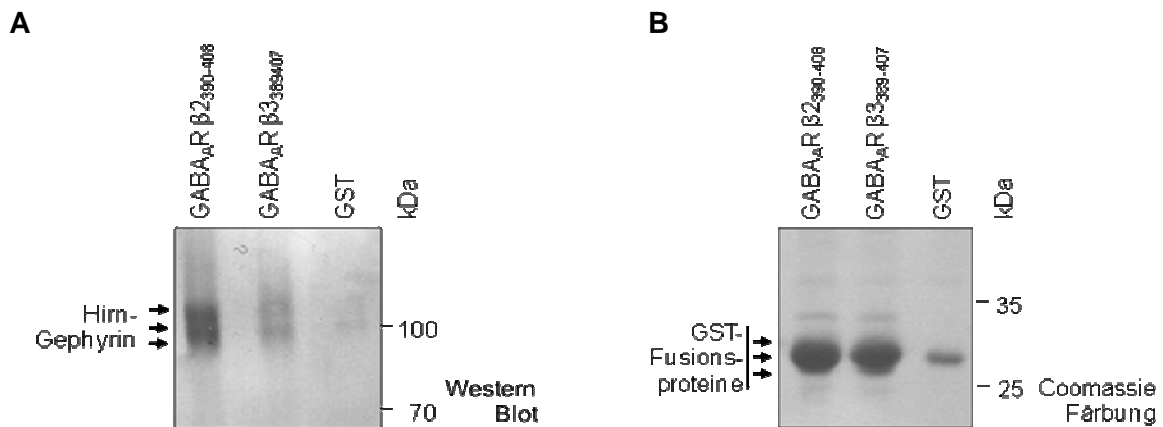


Abb. 2.7: Vergleich der Gephyrin-Interaktion mit dem GABA_AR-β₂³⁹⁰⁻⁴⁰⁸- und -β₃³⁸⁹⁻⁴⁰⁷-Loop. (A, B) Kosedimentation von Gephyrin aus Hirn-Rohextrakt mit GST-fusioniertem GABA_AR-β₂³⁹⁰⁻⁴⁰⁸- und -β₃³⁸⁹⁻⁴⁰⁷-Loop. Mittels Western Blot-Analyse wurde Gephyrin spezifisch nachgewiesen. Die verschiedenen detektierten Gephyrin-Banden (Pfeile) weisen darauf hin, dass unterschiedliche Spleiß-Varianten sedimentiert wurden (A). Die Kontrolle der eingesetzten GST-Rezeptor-Loop beladenen *beads* erfolgte mittels Coomassie-Färbung eines SDS-PA-Gels (B).

2.2.7 Reinigung des GABA_AR-β2-Loops

2.2.7.1 Reinigung GST-fusionierter GABA_AR-β2-Loops

Die Reinigung der GST-fusionierten GABA_AR-β2-Untereinheiten erfolgte affinitätschromatographisch über Glutathion-Sepharose-Matrix. Hierzu wurde nach Zellernte und Zellaufschluss das geklärte Lysat auf die entsprechende Matrix gegeben (vgl. 4.3.2.2). Nach Aufkonzentrierung des Eluats erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mittels Gelfiltration, um eventuell noch vorhandene unspezifische Proteine oder bereits degradiertes Protein der Größe nach vom gewünschten Protein zu trennen. Exemplarisch ist die Reinigung des GST-fusionierten GABA_AR-β₂³⁹⁰⁻⁴²⁰-Loops in Abbildung 2.8 dargestellt. Aufgrund der angefügten GST-Fusion war eine Dimerisierung des GST-Anteils mit einem daraus resultierenden theoretischen Molekulargewicht von 60,8 kDa zu erwarten. Der Loop eluierte nach einem Elutionsvolumen von 54,7 ml, was einem Molekulargewicht von 571 kDa entspricht. Der gereinigte GABA_AR-β₂³⁹⁰⁻⁴²⁰-Loop lag somit als Komplex bestehend aus hochmolekularen Aggregaten vor. Ein vergleichbares Elutionsverhalten während der Größenausschlusschromatographie war ebenfalls für den GABA_AR-β₂³⁰⁶⁻⁴³⁰-Loop, nicht aber für den GlyR-β-

Loop zu verzeichnen. Die in Abbildung 2.8 A zu erkennenden weiteren Elutionsmaxima sind den verschiedenen Degradationsprodukten (vgl. Abb.2.8 C) des Proteins zuzuordnen. Der komplette GST-fusionierte GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop ist ausschließlich im ersten Elutionsmaximum enthalten (Abb.2.8 B). Somit konnten nur diese Fraktionen für weitere Versuche verwendet werden. Die darauffolgenden Fraktionen enthalten einen C-terminal degradierten GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop, der bis zum GST hin abgebaut wurde (Abb.2.8 D). Durch den weiterhin vorhandenen GST-Anteil konnten auch diese Degradationsprodukte über die Glutathion-Sepharose-Matrix aufgetrennt werden. Diese Befunde sind konsistent mit den zuvor beschriebenen Kosedimentationsanalysen (Abb.2.2-2.5), die eine verstärkte Degradation des Fusions-Proteins aus GST und Rezeptor-Loop zeigten und daher schnelles Arbeiten bei 4 °C erforderten.

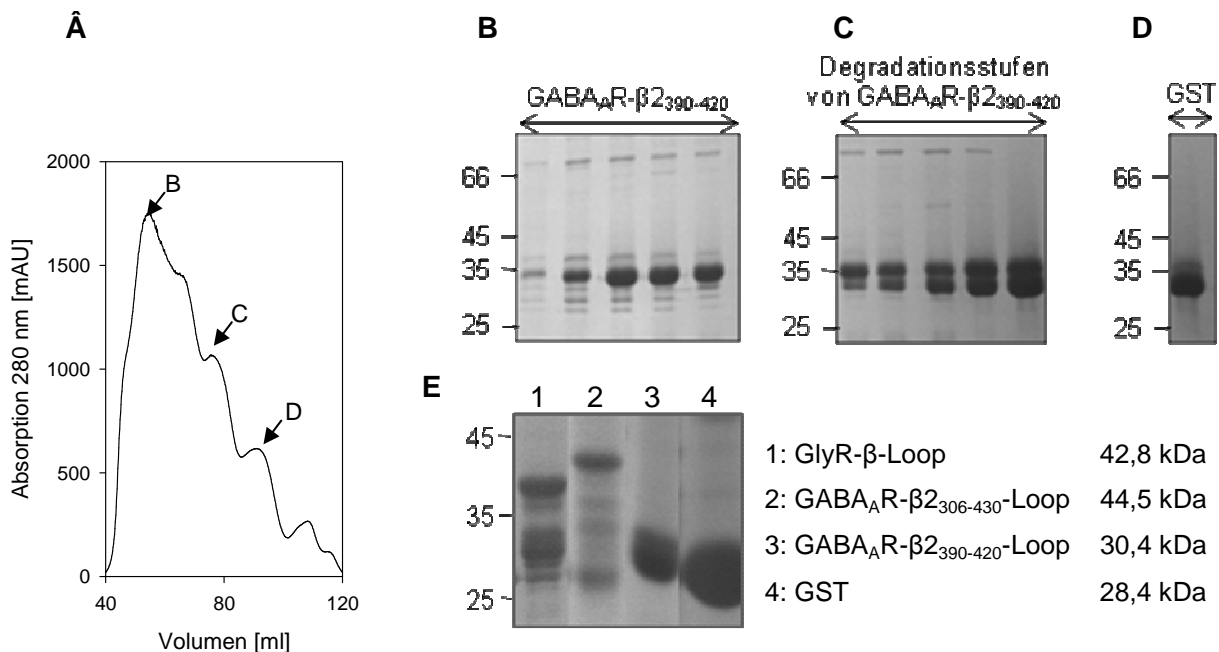


Abb. 2.8: Aufreinigung von in *E. coli* rekombinant exprimiertem GST-GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop. (A) Größenausschlusschromatographie zur weiteren Aufreinigung des GST-fusionierten GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loops nach affinitätschromatographischer Reinigung über Glutathion-Sepharose-Matrix. (B, C, D) Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel der verschiedenen eluierten Peaks. Die Elutionsmaxima der Größenausschlusschromatographie können dem GST-fusionierten GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop (B) sowie zahlreichen Abbaustufen (C) bis hin zum GST (D) zugeordnet werden. (E) Übersicht der verschiedenen gereinigten GST-fusionierten Rezeptor-Loops sowie GST.

2.2.7.2 Reinigung isolierter GABA_AR-β2-Loops

Wie in 2.2.1 beschrieben, kodiert der pGEX-6P-1-Vektor für eine spezifische Protease-Schnittstelle zwischen der GST-Fusion und dem fusionierten Protein. Um die GST-Fusion vom Zielprotein zu entfernen, musste dieses zunächst wie zuvor beschrieben (2.2.7.1) über

Glutathion-Sepharose-Matrix aufgereinigt werden. Anschließend wurde das Eluat in Spaltpuffer umgepuffert und mit *PreScission*-Protease für 4 h bei 4 °C inkubiert. Eine erneute Aufreinigung über Glutathion-Sepharose-Matrix ermöglichte die Separatierung von gespaltenem Loop und GST sowie die Entfernung der ebenfalls GST-fusionierten Protease. Der nicht gebundene Überstand sollte den abgespaltenen Loop enthalten und wurde für eine weitere Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (Superdex 16/60 75, 120 ml SV) verwendet.

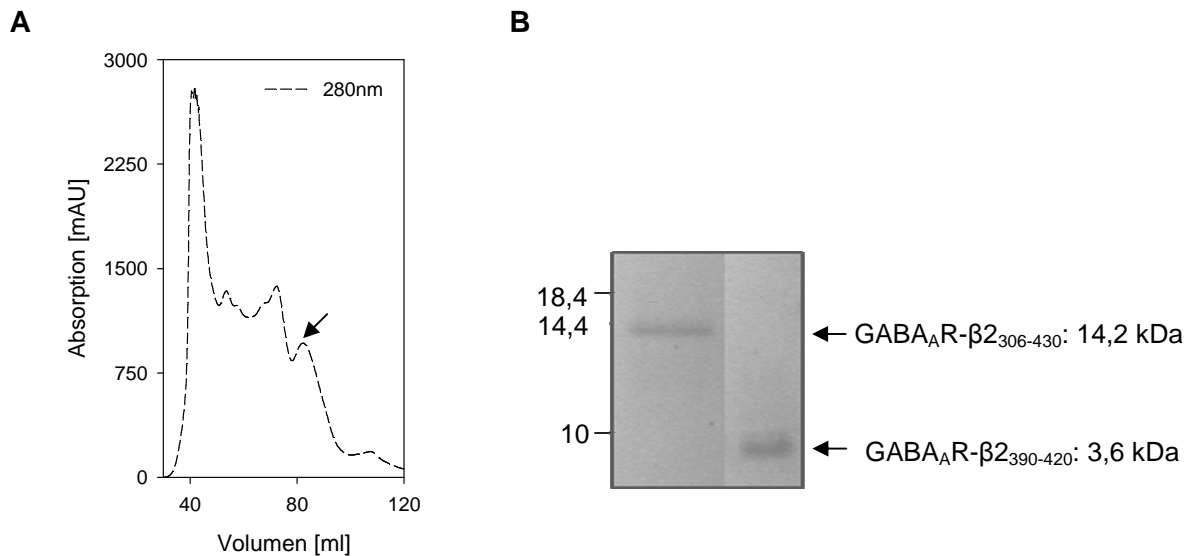


Abb. 2.9: Aufreinigung des isolierten GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loops. (A) Größenausschlusschromatographie nach affinitätschromatographischer Aufreinigung über Glutathion-Sepharose-Matrix und Abspaltung der GST-Fusion mittels *PreScission*-Protease. Detektiert wurde die Absorption bei 280 nm. Der Peak nach einem Elutionsvolumen von 82 ml (Pfeil) entspricht dem dimerisierten Loop (8,4 kDa). (B) SDS-PA-Gel sowie erwartetes Molekulargewicht des isolierten GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀- und -β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loops.

Abbildung 2.9 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie für den isolierten GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop. Das Elutionsprofil zeigte viele verschiedene Peaks, die größtenteils Verunreinigungen, die noch in der Probe vorhanden waren oder GST entsprachen. Trotzdem war es sowohl für die verkürzte Variante als auch für den kompletten GABA_AR-β₂-Loop möglich, das entsprechende Protein ohne GST-Fusion aufzureinigen (Abb.2.9 B). Der isolierte GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop eluierte nach 82 ml (Abb.2.9 A), was einem Molekulargewicht von 8,4 kDa entspricht. Bei einem erwarteten Molekulargewicht von 3,6 kDa stimmt dies in etwa mit einem Dimer überein. Allerdings sei zu beachten, dass das kleinste zur Kalibrierung verwendete Standardprotein ein Molekulargewicht von 15 kDa aufwies. Daher ist die Kalibriergerade für kleinere Proteine

möglicherweise ungenau. Der isolierte GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀-Loop (14,2 kDa) eluierte dagegen als Monomer bei 73 ml mit einem ermittelten Molekulargewicht von 15,8 kDa.

2.2.8 Analyse der Bindungsstöchiometrie zwischen Gephyrin und verschiedenen GABA_AR-β₂-Loop-Varianten

Eine weitere Methode, um eine Interaktion zweier Proteine miteinander zu detektieren, ist die analytische Gelfiltration der entstandenen Proteinkomplexe. Hierbei wurden definierte Mengen der interagierenden Proteine erst separat und nach 20-minütiger Koinkubation über eine präparative Gelfiltrations-Säule (Superdex 200 10/300 GL, 25 ml SV) unter Verwendung einer Äkta Basic 10 aufgetrennt. Kommt es zur Komplexbildung zwischen beiden Proteinen, so ist ein zusätzlicher Peak bei gleichzeitiger Reduktion der Peaks der Einzelkomponenten zu verzeichnen. Durch diese Veränderung kann anhand der eingesetzten Proteinmengen eine Aussage über die Stöchiometrie der Bindung getroffen werden.

Zur Untersuchung der Gephyrin-GABA_AR-β₂ Interaktion wurde hier die analytische Gelfiltration mit verschiedenen gereinigten Proteinen durchgeführt. Verwendet wurde der komplette Loop als GST-Fusion sowie abgespaltenes Peptid. Des Weiteren wurde der verkürzte Loop β₂₃₉₀₋₄₂₀ als GST-Fusion und als biotinyliertes Peptid (vgl. 2.2.11.2) analysiert. Für Letzteres musste die Konzentration geschätzt werden, da aufgrund fehlender aromatischer Aminosäuren kein Extinktionskoeffizient ermittelt werden konnte. Eingesetzt wurden jeweils 4000 pmol Gephyrin sowie 8000 pmol des Rezeptor-Loops.

Der Laufpuffer enthielt eine physiologische Salzkonzentration von 150 mM NaCl und entsprach dem in den Kosedimentationen eingesetzten Puffer.

Es wurde trimeres Gephyrin eingesetzt, welches zusätzlich über Größenausschlusschromatographie aufgereinigt wurde (Abb.2.1 B). Dieses eluierte nach 10,2 ml, was einem Molekulargewicht von 382 kDa und somit – wie erwartet – einem Trimer entsprach (Abb.2.10).

Gereinigtes GST diente als Negativkontrolle, um eine unspezifische Interaktion zwischen Gephyrin und der GST-Fusion der eingesetzten Proteine ausschließen zu können. Wie in Abbildung 2.10 A zu sehen, kommt es zu keiner Verschiebung der Peaks. Sowohl als Einzelproteine sowie nach Koinkubation eluierte Gephyrin nach 10,2 ml als Trimer, während GST nach 13,9 ml mit einem Molekulargewicht von 55 kDa in etwa als Dimer aus der Säule trat. Die Dimerisierung von GST in Lösung ist bekannt (Parker et al., 1990) und war somit zu erwarten. Eine kleinere Fraktion des GST eluierte dagegen schon früher bei 12,1 ml als Hexamer. Somit war kein negativer Effekt des GSTs auf die zu untersuchende Interaktion zu erwarten.

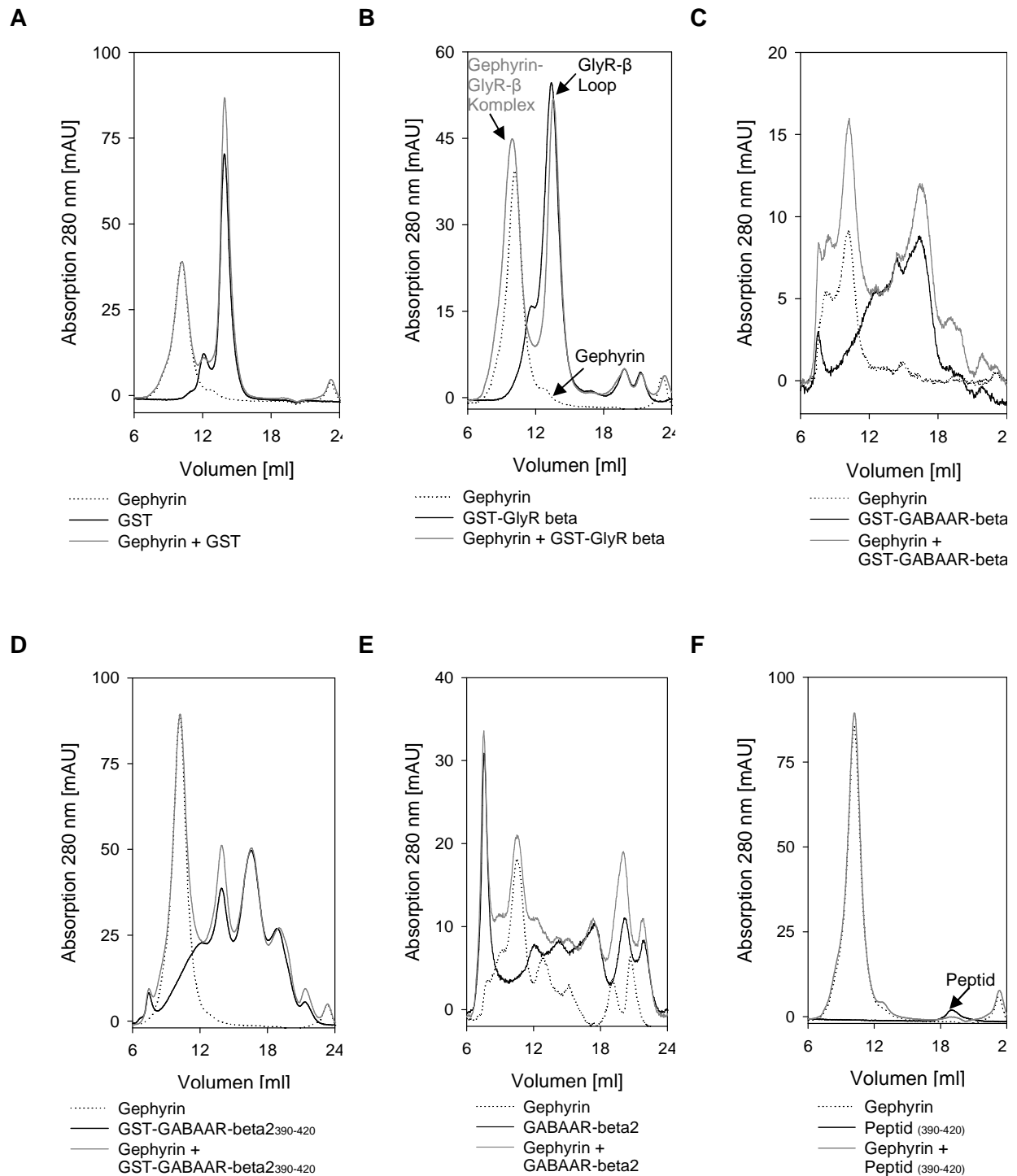


Abb. 2.10: Analytische Gelfiltration mit gereinigtem Gephyrin und GST-fusionierten sowie isolierten GABA_AR- β 2-Loops. Es wurden jeweils 4000 pmol Gephyrin und 8000 pmol der gereinigten Loops separat und nach 20-minütiger Koinkubation über eine analytische Gelfiltrationssäule (Superdex 200 10/300 GL, 25 ml SV) aufgetrennt. Für das GABA_AR- β 2₃₉₀₋₄₂₀-Peptid wurde die Konzentration geschätzt, da kein Extinktionskoeffizient ermittelt werden konnte. Trimeres Gephyrin eluierte nach 10,2 ml. Eine Verschiebung des Gephyrin-Peaks deutet auf Interaktion der koinkubierten Proteine hin. Dies war jedoch nur für die Positivkontrolle, den GlyR- β -Loop, zu beobachten.

Als Positivkontrolle wurde erneut die bereits bekannte Interaktion zwischen Gephyrin und dem GlyR- β -Loop (42,8 kDa) analysiert (Abb.2.10 B). Dieser trat hauptsächlich als Dimer (72,8 kDa) und zu einem geringen Anteil auch als Tetramer (182 kDa) auf. Kleinere, später eluierende Peaks ließen einen leichten Abbau des GlyR- β -Loops vermuten. Nach Koinkubation mit Gephyrin verschob sich der Gephyrin-Peak zu einer früheren Retentionszeit und entsprach einem Molekulargewicht von 432 kDa, während der Peak für den dimeren GST-GlyR- β -Loop nahezu gleich blieb. Auffällig war jedoch, dass nach Koinkubation kein tetramerer Loop mehr zu verzeichnen war. Die Verschiebung des Gephyrin-Peaks zu einer früheren Retentionszeit lässt auf eine Interaktion beider Proteine schließen. Da es allerdings zu keiner signifikanten Abnahme des GlyR- β -Loop-Peaks kam, schien der Loop im Überschuss vorzuliegen, wodurch keine Angaben zur Stöchiometrie der Bindung möglich sind.

Für die eingesetzten GABA_AR- β 2-Loops sind anhand der Ergebnisse dagegen keine Aussagen bezüglich einer Gephyrin-Interaktion möglich. Sowohl für den kompletten, als auch für den verkürzten Loop ergab sich nach Koinkubation ein vergleichbares Elutionsprofil zu den Läufen mit den Einzelproteinen. Somit kam es zu keiner messbaren Komplexbildung zwischen den Proteinen. Auffällig ist, dass der komplette Loop sowohl vor, als auch nach Koinkubation zum einen als größeres Aggregat (1477 kDa) und anschließend über ein längeres Elutionsvolumen und nicht in einem eindeutigen Peak eluierte (Abb.2.10 C). Dieser Peak erstreckt sich über 6 ml und entspricht mehreren Oligomerisierungs- bzw. Degradationsstufen (Tetramer, Dimer, Monomer, Abbau). Der verkürzte Loop (GABA_AR- β 2₃₉₀₋₄₂₀) wies dagegen definiertere Peaks auf, die jedoch ebenfalls verschiedenen Zuständen des Proteins zuzuordnen sind. Somit trat das Protein als höheres Aggregat (1571 kDa), Tetramer (109 kDa), Dimer (56 kDa) und in zahlreichen Abbauprodukten von der Säule (Abb.2.10 D). Im Vergleich dazu konnten Messungen mit dem isolierten GABA_AR- β 2₃₀₆₋₄₃₀-Loop vernachlässigt werden, da aufgrund zahlreicher Peaks im Elutionsprofil keinerlei genaue Aussage möglich war. Trotz einer definierten Einzelbande nach der Aufreinigung (Abb.2.9 B) schien es sich bei dem isolierten Loop um keine saubere Proteinfraction zu handeln bzw. das Protein lag in sehr vielen aggregierten Formen vor (Abb.2.10 E). Bei einem erwarteten Molekulargewicht von 14,2 kDa ergaben sich durch die verschiedenen Peaks ermittelte Molekulargewichte von 1477 kDa, 144 kDa (Dekamer), 43 kDa (Trimer), 8,8 kDa (~Monomer), 2,2 und 0,8 kDa (Abbau). Trotz der vielen Peaks und somit Oligomerisations- und Abbauzuständen in den Ansätzen war eindeutig zu erkennen, dass es zu keiner charakteristischen Veränderung der Gephyrin- oder Loop-Elutionen nach Koinkubation kam, wobei leichte Schwankungen in den Peak-Höhen als insignifikant betrachtet wurden. Somit konnte für diese Proteine mittels dieser Methode keine

Komplexbildung nachgewiesen und damit keine weiteren Aussagen hinsichtlich der Interaktion mit Gephyrin gemacht werden.

Zusätzlich wurde ein biotinyliertes Peptid, das der Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA_AR-β2-Loop (Aminosäuren 390-420) entsprach (vgl. 2.2.11.2), analysiert und mit Gephyrin koinkubiert (Abb.2.10 F). Dieses Peptid (3,6 kDa) eluierte in einem sauberen Peak nach 19 ml und entsprach somit einem Monomer von 3,9 kDa. Der Peak wies nur eine sehr geringe Absorption auf, was durch die fehlenden aromatischen Aminosäuren in der Sequenz zu erklären ist. Eine Messung bei 205 nm spiegelt die Absorption der Peptidbindung wieder und führte, abgesehen von einer erhöhten Absorption, zum selben Ergebnis. Allerdings ergab die Messung des Gephyrins bei 205 nm einen sehr stark absorbierenden und somit nicht eindeutig definierten Peak, weshalb hier nur die Messungen bei 280 nm dargestellt sind. Nach Koinkubation des Peptids mit Gephyrin ergab sich keine eindeutige Änderung des Gephyrin-Peaks. Allerdings war eine deutliche Abnahme des Peptid-Peaks (Absorption_{205 nm} von 303,66 mAU in der Einzelmessung gegen 154,32 mAU nach Koinkubation) zu verzeichnen (messbar sowohl bei 280, als auch 205 nm). Dies lässt vermuten, dass es möglicherweise zu einer Interaktion kam. Es wäre denkbar, dass zwar eine Bindung an das Gephyrin stattgefunden hat, diese aber nicht messbar ist, da aufgrund der Größenunterschiede zwischen Gephyrin und dem Loop die daraus resultierenden minimalen Veränderungen im Molekulargewicht nicht detektierbar sind. Möglicherweise kommt es nach der Komplexbildung zur langsamen Abdissoziation des Peptids, so dass keine weitere Änderung im Gephyrin-Peak induziert wird.

Zur weiteren Analyse wurden auch analytische Gelfiltrationen unter Verwendung einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt (Acquity BEH200 Säule, 2,4 ml SV, 1,7 µm Partikelgröße). Durch ein weitaus geringeres Injektionsvolumen (hier: 0,5-3 µl) und eine deutlich geringere Laufzeit pro Trennung (8 min) bietet dieses System den Vorteil, dass wesentlich mehr verschiedene experimentelle Bedingungen ausgetestet werden können. Aufgrund dessen wurden die koinkubierten Proteine nach 0, 10, 20, 30 und 40 min Koinkubation analysiert, um mögliche Unterschiede darstellen zu können. Die eingesetzten Proteine sowie die resultierenden Gelfiltrations-Läufe entsprachen denen aus Abbildung 2.10. Auch mittels dieses Systems waren keine eindeutigen Verschiebungen bzw. Abnahmen der Peaks zu verzeichnen, weshalb die entsprechenden Ergebnisse hier nicht dargestellt sind. Die Verwendung unterschiedlicher Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 bzw. 7,5) sowie Proteinmengen änderte dies nicht. Es konnte bestätigt werden, dass die verschiedenen gereinigten Loops keine definierten Elutionszeiten aufwiesen und somit in unterschiedlichen Aggregationsformen bzw. degradiert vorlagen.

Somit ergab sich aus beiden hier durchgeführten Gelfiltrations-Analysen keine weitere Aussage bezüglich der Gephyrin-GABA_AR-β2 Interaktion und dessen Stöchiometrie. Möglicherweise ist die Interaktion zu schwach und mittels Gelfiltration nicht nachweisbar, da die Komplexe während der Auftrennung wieder dissoziieren.

2.2.9 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung können Aussagen über die Größe von Proteinen in Proteinlösungen und somit auch über deren Oligomerisierungsstatus sowie deren Homogenität gemacht werden. Das eingestrahlte Laserlicht wird durch die in der Lösung befindlichen Teilchen gestreut, wobei es durch die sich bewegenden Partikel zu einer Fluktuation der Streuungsintensität kommt. Basierend auf Brown'scher Molekularbewegung sind kleine Moleküle beweglicher als große und es kommt zu einer stärkeren Fluktuation. Aufgrund der zurückgelegten Distanz innerhalb einer bestimmten Zeit kann der Diffusionskoeffizient und daraus der hydrodynamische Radius der Partikel ermittelt werden. Dieser ermöglicht wiederum Aussagen über das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine. Des Weiteren liefert das DLS Informationen über die massenmäßige Verteilung der Moleküle (Polydispersität) sowie die Partikelgrößenverteilung (monomodal oder multimodal).

Während der analytischen Gelfiltration bzw. der Reinigung zeigte sich, dass die eingesetzten Proteine inhomogen waren bzw. in aggregierter Form vorlagen. Um zusätzliche Informationen über die Proteine und deren Oligomerisierungsstatus zu erlangen, wurden sie der dynamischen Lichtstreuung unterzogen.

2.2.9.1 DLS-Messungen mit gereinigten Rezeptor-Loops

Die Analyse der verschiedenen Proteine wies auf unterschiedliche Oligomerisationsformen hin. GST (Abb.2.11 A) war wie erwartet ein Dimer. Generell deutet eine Polydispersität von unter 15 % darauf hin, dass es sich um eine homogene Lösung handelt. Des Weiteren spricht ein Masseanteil von >99 % für eine monomodale Lösung, in der größere Aggregate insignifikant und zu vernachlässigen sind. Die Polydispersität von GST betrug 13 % mit einem Masseanteil von 100 %. Somit lag das Protein in einer homogenen, monomodalen Lösung vor.

Im Gegensatz dazu war für den GlyR-β-Loop eine polydisperse Lösung messbar (34 % Polydispersität). Diese schien zwar unter Berücksichtigung der Prozentigkeit der Masse (100 %) ebenfalls monomodal zu sein, allerdings wurde nicht nur ein einzelner Peak gemessen. Die verschiedenen Peaks erstreckten sich über einen großen Bereich des ermittelten Radius und entsprachen somit verschiedenen Molekulargewichten. Im Mittel gab das Programm ein Molekulargewicht von 195 kDa vor, was einem Pentamer und nicht wie

erwartet (verglichen mit der Gelfiltration) einem Dimer entsprechen würde. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Peaks ist allerdings in Hinblick auf den Aggregationszustand des GlyR- β -Loops keine genaue Aussage möglich. Des Weiteren wurden unterschiedliche Proben des GlyR- β -Loops gemessen, die sich im Grad der Aufkonzentrierung unterschieden. Möglicherweise nimmt mit steigender Konzentration in der Proteinlösung das Aggregationsverhalten zu und führt zu einer polydispersen Verteilung des Proteins. Dies war jedoch nicht der Fall, sondern es waren keinerlei Unterschiede messbar (Daten nicht gezeigt).

Sowohl die Messungen für GST-fusionierten als auch nicht-fusionierten GABA_AR- β 2-Loop (Abb.2.11 B) ergaben ähnliche Ergebnisse wie für den GlyR- β -Loop. Es handelte sich somit auch hier um eine polydisperse Lösung, bei der Aggregate mit unterschiedlichen Radien und somit Proteinkomplexe mit variierenden Molekulargewichten detektiert werden konnten. Dies war vor allem für den isolierten Loop sehr auffällig und entspricht den Beobachtungen während der analytischen Gelfiltration. Es schien nicht möglich zu sein, eine homogene Fraktion des abgespaltenen Loops zu isolieren (vgl. 2.2.8). Interessanterweise war für den GST-fusionierten GABA_AR- β 2-Loop ein kleiner Peak, der einer homogenen Lösung und einem dimeren Molekulargewicht entspricht, zu verzeichnen. Trotz der geringen Intensität des Peaks (3,7 %) ist davon auszugehen, dass der Großteil aller Loops dieser Konfiguration entspricht, da dessen Anteil am gestreuten Licht aufgrund der sehr geringen Masse sehr klein ist. Wie schon zuvor beobachtet, scheint das starke Degradationsverhalten des Loops zur hohen Inhomogenität der GST-fusionierten Loops beizutragen. Möglicherweise aggregieren die Abbauprodukte oder der komplette Loop und führen zu dem hier gezeigten Ergebnis (Abb. 2.11).

Der verkürzte GST-GABA_AR- β 2₃₉₀₋₄₂₀-Loop zeigte dagegen ein ähnliches Verhalten wie schon für das gereinigte GST beobachtet werden konnte. Zwar ist die Polydispersität im Gegensatz zum GST etwas erhöht (16 gegen 13 %), aber es handelt sich ebenfalls um eine monomodale Lösung, in der die größeren Aggregate vernachlässigt werden können. Außerdem erstreckt sich der Bereich der gemessenen Radien über einen weitaus kleineren Bereich verglichen mit dem GABA_AR- β 2- und dem GlyR- β -Loop. Das daraus ermittelte Molekulargewicht entspricht wie erwartet einem Dimer (Abb.2.11 B).

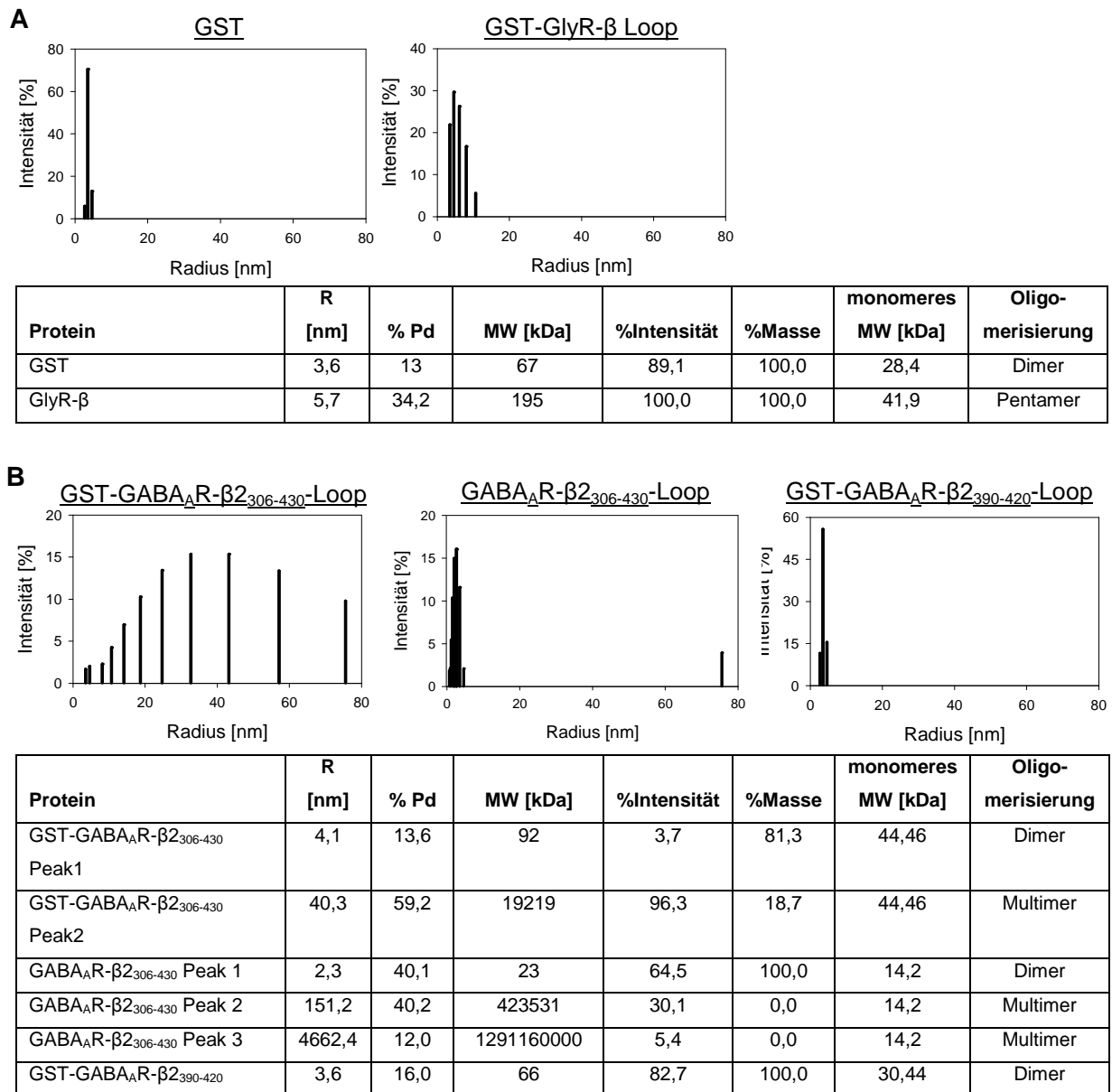
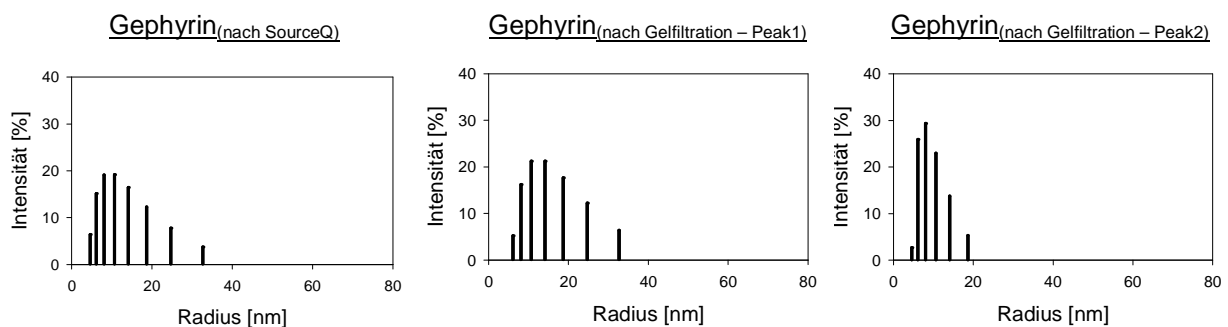


Abb.2.11: Untersuchung der Homogenität und des Oligomerisierungsstatus verschiedener Proteinlösungen mittels dynamischer Lichtstreuung. (A) Die Negativkontrolle GST liegt als Dimer in einer homogenen Lösung vor, während der GlyR-β-Loop eine sehr polydisperse, inhomogene Lösung aus vielen Aggregaten bildet. (B) Sowohl der GST-fusionierte als auch der nicht-fusionierte GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀-Loop zeigen eine sehr polydisperse, inhomogene Lösung, wobei sich der nicht-fusionierte Loop in seinem Spektrum über mehrere Multimerisierungsformen erstreckt. Die höheren Aggregationsformen wurden aufgrund einer besseren Übersicht in den Diagrammen vernachlässigt und nur in den Tabellen dargestellt. Ähnlich wie GST liegt der GST-fusionierte GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop dagegen relativ homogen als Dimer vor – größere Aggregate können vernachlässigt werden. Es wurden 1-5 mg/ml der jeweiligen Proteine eingesetzt und 20 Scans pro Messung durchgeführt. R: Radius, Pd: Polydispersität, MW: Molekulargewicht; Peak1-3: Details zu den verschiedenen Oligomerisierungsformen.

2.2.9.2 DLS-Messungen mit gereinigtem Gephyrin

Das Aggregationsverhalten von Gephyrin in Abhängigkeit des Reinheitsgrades sollte ebenfalls untersucht werden. Dazu wurden Proben nach Reinigung über einen Anionenaustauscher sowie Proben von den zwei mittels Gelfiltration erhaltenen Peaks (Abb.2.1) analysiert. Wie erwartet zeigte die Probe nach der Anionenaustauscherchromatographie eine polydisperse (54,3 % Polydispersität), multimodale Lösung mit höheren Aggregaten. Dies war nicht verwunderlich, da es sich hierbei um das Proteingemisch handelt, das erst im nächsten Schritt mittels Größenausschlusschromatographie weiter aufgetrennt wurde (Abb.2.1 B) und somit Proteinkomplexe verschiedener Größe enthält.



Protein	R [nm]	% Pd	MW [kDa]	%Intensität	%Masse	monomeres MW [kDa]	Oligomerisierung
Gephyrin (nach SourceQ)	12,6	54,3	1254	100,0	100,0	85,4	Oligomer
Gephyrin (nach Gelfiltration – Peak1)	15,3	46,2	1979	100,0	100,0	85,4	Oligomer
Gephyrin (nach Gelfiltration – Peak2)	9,5	36,6	646	100,0	100,0	85,4	Hexamer

Abb. 2.12: Untersuchung der Homogenität und des Oligomerisierungsstatus von Gephyrin in Abhängigkeit vom Reinigungsgrad mittels dynamischer Lichtstreuung. Nach Reinigung über einen Anionenaustauscher war Gephyrin in einem Gemisch aus höheren Oligomeren nachweisbar. Mittels Gelfiltration konnten diese getrennt werden und Gephyrin lag zum einen als Hexamer und zum anderen als Gemisch aus Multimeren vor. R: Radius, Pd: Polydispersität, MW: Molekulargewicht.

Abbildung 2.12 zeigt, dass – wie erwartet – der erste Peak nach der Gelfiltration höher oligomerisiertes Gephyrin enthielt als der zweite Peak. Allerdings ergab sich nach der Größenausschlusschromatographie ein ermitteltes Molekulargewicht von 637 kDa für diesen ersten Peak, wohingegen die hier gezeigten Messungen auf ein weitaus höheres Aggregat (1979 kDa) schließen lassen. Dies lässt vermuten, dass nach der Trennung mittels Gelfiltration eine weitere Aggregation des Gephyrins in Lösung stattgefunden hat. Dagegen entspricht der zweite Reinigungs-Peak einem Gephyrin-Hexamere (646 kDa). Dies ist

verwunderlich, da für diese Proteinfraktion ein trimeres Verhalten während der Gelfiltration gezeigt werden konnte. Somit wurden zwar deutlich die Unterschiede zwischen den einzelnen Reinigungsschritten bezüglich des Oligomerisierungsverhaltens von Gephyrin aufgezeigt, allerdings entsprachen diese nicht vorherigen Ergebnissen (vgl. Abb.2.1). Es sei jedoch zu beachten, dass auch bei den in Abbildung 2.12 gezeigten Messungen kein einzelner, sauberer Peak zu verzeichnen war. Dies lässt wie schon bei den Rezeptor-Loops auf ein Proteingemisch aus verschiedenen Aggregationszuständen schließen. Durch die hohe Polydispersität (54,3, 46,2 bzw. 36,6 %), was für eine inhomogene Lösung spricht, wird dies zusätzlich unterstrichen. Somit ist das angegebene Molekulargewicht aus den verschiedenen Peaks gemittelt und ein ungefährender Richtwert.

2.2.10 Isothermale-Titrations-Kalorimetrie (ITC)

Zur weiteren Charakterisierung und zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten zwischen Gephyrin und dem GABA_AR-β2-Loop wurden ITC-Messungen durchgeführt. Diese ermöglichen eine genaue Aussage zum Bindungsverhalten hinsichtlich Affinität, Stöchiometrie und Anzahl der Bindungsstellen. Hierzu wurde Gephyrin als Analyt (20-40 μM) und die verschiedenen, gereinigten Rezeptor-Loops als Liganden (200-800 μM) verwendet. Aufgrund von Instabilität und erhöhter Degradation mussten die Rezeptor-Loops jeweils frisch gereinigt und direkt im Anschluss für die Messung eingesetzt werden. Es wurden Messungen sowohl mit dem kompletten GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀, als auch mit dem verkürzten Loop (β₂₃₉₀₋₄₂₀) als GST-Fusionsprotein und als isoliertes Protein/ Peptid durchgeführt. Da während der Reinigung der GABA_AR-β2-Loops vermehrt Degradation zu beobachten war, wurden beide Varianten – mit und ohne GST-Fusion eingesetzt.

Als Negativkontrolle wurden Messungen mit gereinigtem GST durchgeführt, die allerdings keine spezifische Bindung an Gephyrin zeigten (Abb.2.13 A), so dass die Verwendung GST-fusionierter Rezeptor-Loops hinsichtlich falsch positiver Ausschläge unbedenklich war. Um einen weiteren Einfluss der GST-Fusion auszuschließen bzw. beurteilen zu können, wurden Kontrollmessungen mit gereinigtem GST-GlyR-β-Loop durchgeführt, da es durch die Dimerisierung des GSTs zu Veränderungen in der Faltung des Loops kommen könnte. Da für den isolierten GlyR-β-Loop bereits ITC-Daten vorliegen, können diese mit den erhaltenen Ergebnissen des fusionierten Loops verglichen werden und somit Aussagen über einen möglichen Einfluss der GST-Fusion auf das Bindungsverhalten zu Gephyrin getroffen werden. Messungen mit gereinigtem Gephyrin ergaben eine exotherme Bindung des GST-GlyR-β-Loops mit einem monophasischen Bindungsverhalten und einem K_D-Wert von 0,9 ± 0,1 μM (Abb.2.13 B). Eine Auswertung im biphasischen Modus war nicht möglich.

Im Vergleich zum GlyR- β -Loop (Abb. 2.13 B) zeigten alle Messungen mit gereinigten GABA_AR- β 2-Loops (komplett und verkürzt als GST-Fusion bzw. isoliertem Loop) eine endotherme Reaktion. Da jedoch die resultierende freie Enthalpie ΔG negativ war, kann trotzdem von einer spontan stattfindenden Reaktion ohne nötige Wärmezufuhr ausgegangen werden. Die Bindungskurve ergab für alle gemessenen Proteine eine vergleichbare, monophasische Bindung an Gephyrin.

Anhand der Messungen mit dem kompletten Loop (Abb. 13 C) konnte eine Bindungsaffinität des Loops zu Gephyrin von 25,38 μM ermittelt werden und ist somit um ca. das 30-fache höher als die Affinität von Gephyrin zum GlyR- β -Loop. Es ist nur eine leichte Abnahme der Peak-Intensitäten sowie eine hohe Hintergrundwärme während der Messungen zu verzeichnen. Des Weiteren wurde die Sättigung nicht erreicht. Die verkürzte Variante (Reste 390-420; Abb. 13 D) wies ebenfalls eine endotherme Reaktion auf, die nahezu gesättigt war. Für den GABA_AR- β 2₃₉₀₋₄₂₀-Loop ergibt sich somit ein K_D -Wert von $9,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Dies wies – verglichen mit dem GlyR- β -Loop – auf eine mindestens 10-fach schwächere Bindung des GABA_AR- β 2-Loops an Gephyrin hin.

Als weitere Negativkontrolle wurde anstelle von Gephyrin Puffer als Analyt eingesetzt. Hierzu wurde der Loop gereinigt und die entsprechende Menge für zwei Messungen vorbereitet. Es wurde mit diesem Protein zunächst eine Messung durchgeführt, in der Puffer als Analyt vorlag. Anschließend wurde das restliche Protein für eine Messung mit Gephyrin eingesetzt. Somit waren beide Läufe in Bezug auf den verwendeten Loop identisch und konnten miteinander verglichen werden. Daraus ergab sich eine exakt mit den vorigen Messungen vergleichbare Bindungskurve (Abb. 2.13 D, E). Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei allen gemessenen Bindungskurven mit dem GABA_AR- β 2-Loop um unspezifische Reaktionen handelte, die durch die Titration des Rezeptor-Loops in die Zelle entstanden sind. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der Rezeptor-Loop möglicherweise mit sich selbst interagiert (wie bereits durch Gelfiltration und DLS gezeigt). Durch Injektion des Liganden in die Zelle – zum Analyten – wird das Protein verdünnt, was die Neueinstellung des Bindungsgleichgewichtes zwischen den verschiedenen Multimeren zur Folge hat und mit einer Wärmeänderung einhergeht

Die Verwendung der Proteine in verschiedenen Konzentrationen sowie die Änderung der Pufferzusammensetzung oder die Nutzung von Gephyrin als Ligand und des Rezeptor-Loops als Analyt führten ebenfalls zu keinen auswertbaren Ergebnissen. Daher konnten die ITC-Messungen nicht zur weiteren Charakterisierung der Bindung zwischen Gephyrin und dem GABA_AR- β 2-Loop genutzt werden.

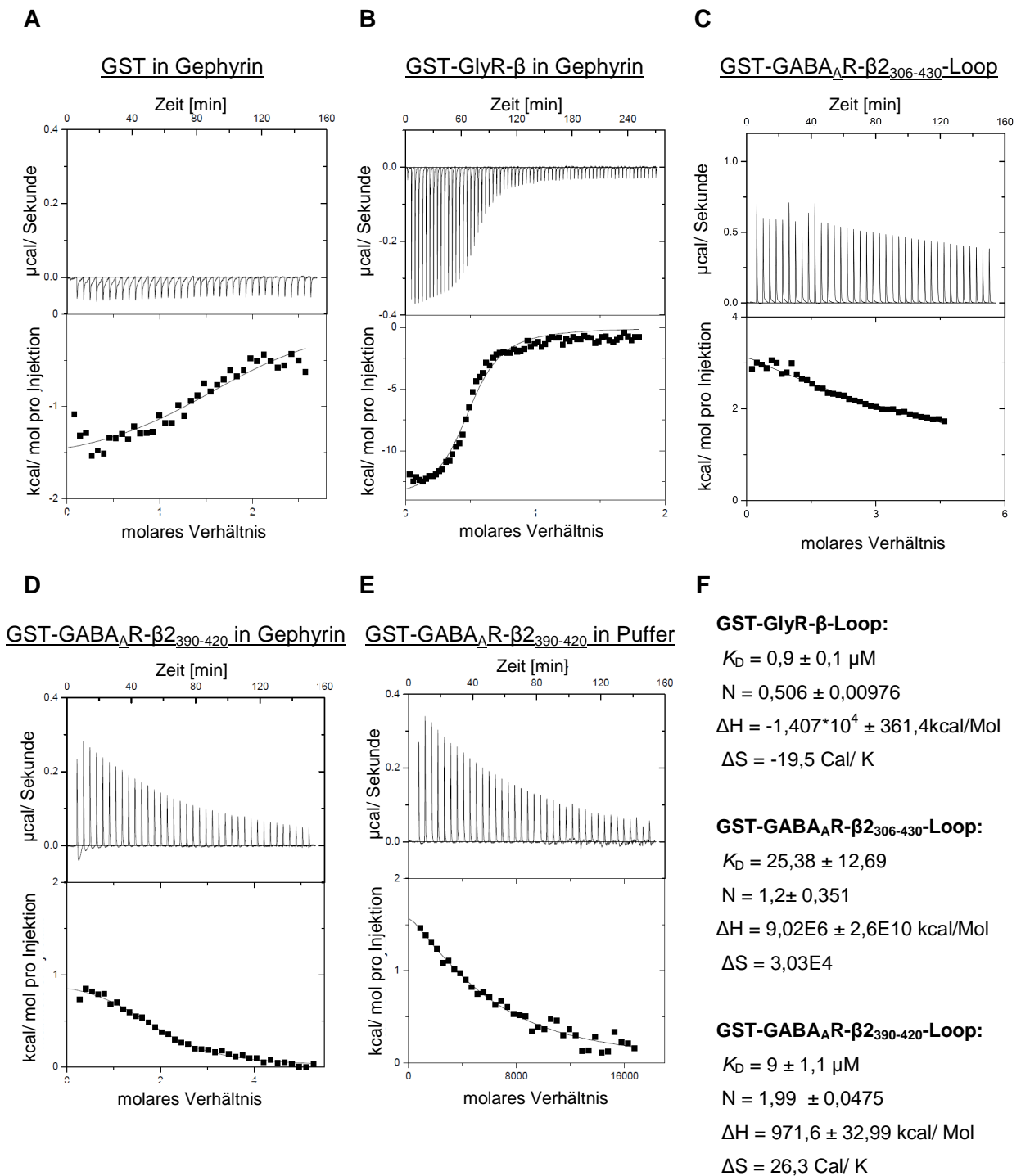


Abb. 2.13: Isothermale-Titrations-Kalorimetrie. Die Liganden GST (A), GST-GlyR-β-Loop (B), GST-GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀-Loop (C) und GST-GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop (D, E) wurden in den Analyten Gephyrin (A, B, C, D) bzw. Puffer (E) titriert. Es wurden 200-800 μM des Liganden mit einem Injektionsvolumen von 8-12 μl sowie 20-40 μM des Analyten für die Messungen eingesetzt. (F) Ermittelte Bindungsaffinitäten sowie weitere Parameter für die Interaktionen zwischen Gephyrin und dem GlyR-β- bzw. GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop. K_D = Dissoziationskonstante; N = Stöchiometrie; H = Enthalpie; S = Entropie.

2.2.11 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR)

2.2.11.1 SPR-Messungen mit kovalent gekoppeltem Gephyrin

Aufgrund der oben geschilderten Probleme während der ITC-Messungen erfolgte eine weitere Spezifizierung der Bindungsaffinität zwischen Gephyrin und dem GABA_AR-β2-Loop mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR). Dazu wurde zunächst Gephyrin – als Ligand – kovalent über freie Amine an einen Carboxylmethyl-dextran-Hydrogel-Sensorchip gekoppelt. Da die abgespaltenen GABA_AR-β2-Loops – insbesondere die verkürzte Variante – aufgrund ihres Molekulargewichts zu geringe Veränderungen in der Resonanz liefern würden, waren diese als Analyten nicht geeignet. Aus diesem Grund wurden die GST-fusionierten GABA_AR-β2-Loops (komplett und verkürzt) als Analyten eingesetzt. Dabei diente gereinigtes GST als Negativ- und der GST-fusionierte GlyR-β-Loop als Positivkontrolle. Die Positivkontrolle war nötig, da bisher veröffentlichte Daten zu Bindungsstudien zwischen Gephyrin und dem Glycin- sowie GABA_A-Rezeptor hauptsächlich auf ITC-Messungen basierten. Ausschließlich Sola und Kollegen (2004) führten SPR-Messungen mit Gephyrin und dem GlyR-β-Loop durch, was in einem K_D -Wert von 0,4–1,1 μM resultierte. Um einen negativen Einfluss der verwendeten Methode in die Auswertung mit einzubeziehen, wurden Messungen mit der Positivkontrolle hier ebenfalls durchgeführt. Zusätzlich war der Vergleich mit dem GST-fusionierten GlyR-β-Loop nötig, um eine eventuelle Beeinflussung durch den GST-tag ausschließen bzw. mit einbeziehen zu können.

Die Messungen mit den verschiedenen Rezeptor-Loops konnten aufgrund verschiedener Löslichkeiten der Loops nicht im selben Puffer durchgeführt werden. Es wurden alle Messungen mit dem GlyR-β-Loop in Tris-Puffer mit einer relativ hohen Salzkonzentration (10 mM Tris/ HCl pH 8,0, 250 mM NaCl) durchgeführt, wohingegen für die Messungen mit den GABA_AR-Loops eine niedrigere Salz- und eine leicht erhöhte Tris-Konzentration (20 mM Tris/ HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) notwendig war. Somit scheint die Art der Interaktion sowie die Stabilität und Faltung der Loops aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenz durch die Salzkonzentration im Puffer beeinflusst zu werden. Daher entspricht nur der für die GABA_A-Rezeptoren verwendete Puffer einer physiologischen Salzkonzentrationen. Darüber hinaus binden beide Proteine – wie oben gezeigt – über dieselbe Bindungstasche an Gephyrin, so dass die beobachteten Unterschiede auf weitere bindungsrelevante Bereiche in Gephyrin schließen lassen.

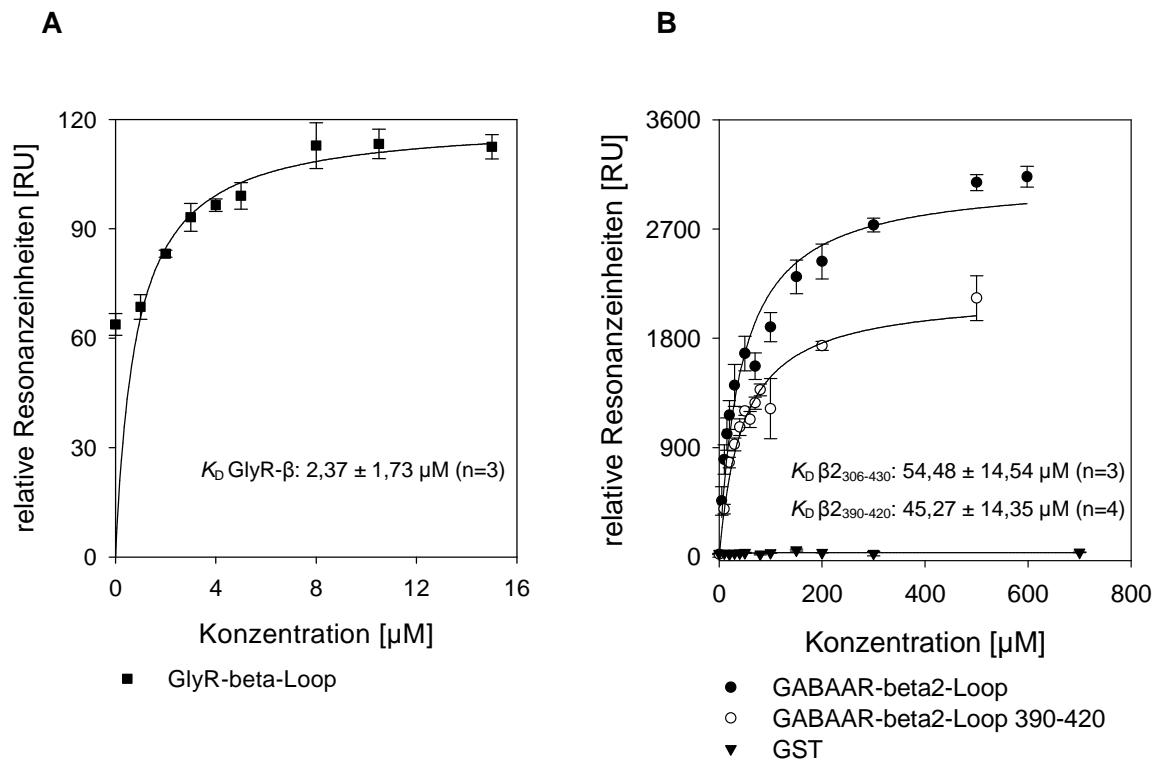


Abb. 2.14: Charakterisierung der Interaktion zwischen den Loops der GlyR-β- bzw. GABA_AR-β₂-Untereinheit und Gephyrin mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie. (A, B) Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen wurden mit einem Carboxylmethyl-dextran-Hydrogel Sensorchip durchgeführt, an dessen Flusszelle Gephyrin kovalent über freie Amine gekoppelt wurde. Als Analyten wurden der GST-fusionierte GlyR-β-Loop als Positivkontrolle (A) sowie der GST-fusionierte GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀- und der verkürzte, ebenfalls GST-fusionierte β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop eingesetzt (B). Als Negativkontrolle diente gereinigtes GST (B). Die K_D-Werte geben Auskunft über die Stärke der Bindung, wobei der GlyR-β-Loop eine 20-fach höhere Affinität zu Gephyrin aufweist als der GABA_AR-β₂-Loop. n: Anzahl der Messungen.

Für eine einzelne Messung wurden verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Analyten (GABA_AR-β₂-Varianten, GST: 0-800 µM; GlyR-β: 0-25 µM) eingesetzt. Die resultierenden Resonanzeinheiten wurden in dreifacher Bestimmung pro Konzentration gemessen und für spätere Analysen gemittelt, wodurch auch die Berechnung der Standardabweichung ausgehend von der Grundgesamtheit (Stabwn), möglich war. Die aus den verschiedenen Messungen ermittelten Bindungsaffinitäten (K_D-Werte) wurden ebenfalls gemittelt und sind in Abbildung 2.14 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Bindungskurve zwischen den Rezeptor-Loops und der GST-Kontrolle, woraus zu schließen ist, dass keine unspezifische Bindung des GSTs an Gephyrin erfolgt und somit die Ergebnisse für die Rezeptor-Loops nicht verfälscht sind. Die ermittelten K_D-Werte für die beiden verwendeten GABA_AR-β₂-Loops liegen in einem vergleichbaren Bereich, wobei der K_D-Wert für den verkürzten Loop mit 45,27 ± 14,35 µM etwas niedriger ist als für den

kompletten Loop mit einem K_D -Wert von $54,48 \pm 14,54 \mu\text{M}$. Die entstandenen Differenzen können möglicherweise durch Unterschiede in der Reinheit der Proteine erklärt werden, sind aber als nicht signifikant zu betrachten. Wie in Abbildung 2.8 zu sehen, ist es nicht ausgeschlossen, dass sich neben dem gewünschten Fusionsprotein auch bis hin zum GST degradiertes Protein im Reinigungsansatz befindet. Außerdem konnte bei den Reinigungen beobachtet werden, dass die Stabilität des kompletten Loops vergleichsweise geringer war als die des verkürzten Loops. Dies macht eine genaue Bestimmung der Konzentration des intakten Fusionsproteins unmöglich und kann somit die Ermittlung des K_D -Wertes durchaus verfälschen und zu Unterschieden führen.

Im Vergleich zur GABA_AR- β 2-Untereinheit konnte für den GlyR- β -Loop ein deutlich niedriger K_D -Wert ($2,37 \pm 1,73 \mu\text{M}$) und somit eine wesentlich höhere Affinität zu Gephyrin ermittelt werden. Daraus gibt sich im direkten Vergleich eine rund 20-fach geringere Affinität der GABA_AR- β 2-Untereinheit zu Gephyrin als es für die GlyR- β -Untereinheit der Fall ist. Eine verminderte Affinität wurde durchaus erwartet, da schon in den Kosedimentationsanalysen eine deutlich schwächere Bindung der GABA_AR- β 2-Untereinheit im Vergleich zur GlyR- β -Untereinheit zu verzeichnen war (vgl. Abb.2.4).

2.2.11.2 SPR-Messungen mit biotinyliertem GABA_AR- β 2₃₉₀₋₄₂₀-Peptid

Für weitere Analysen der Bindungsstärke wurden SPR-Messungen mit einem synthetisierten Peptid verwendet, welches die Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA_AR- β 2-Loop trug (Aminosäuren 390-420) und am N-Terminus biotinyliert war (die Synthese erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Neundorff, Institut für Biochemie, Universität zu Köln). Das angefügte Biotin ermöglicht die spezifische Kopplung des Peptids an einen Streptavidin-gekoppelten Sensorchip. Durch die hohe Affinität zwischen Biotin und Streptavidin (10^{-5} - 10^{-6} nM) ist diese Kopplung einer kovalenten Bindung gleichzusetzen und nicht reversibel. Ein weiterer Vorteil zu den vorigen Messungen war, dass kein GST-gekoppeltes Fusionsprotein vorlag.

Gereinigtes Gephyrin rC4 wurde in verschiedenen Konzentrationen (0-68 μM) als Analyt eingesetzt. Erste Messungen ergaben eine gesättigte Bindungskurve, anhand derer ein K_D -Wert von 9.7 μM ermittelt werden konnte (Abb. 2.15). Dieser ist im Vergleich zu den Messungen mit kovalent gekoppeltem Gephyrin und GST-fusionierten Rezeptor-Loops (vgl. 2.2.11.1) ca. um ein Fünftel niedriger. Parallel sollten auch Messungen mit einem Phospho-Peptid durchgeführt werden, um den in den Kosedimentationen beobachteten Effekt des Serins 410 (vgl. Abb.2.5) zu verifizieren. Das Peptid trug ebenfalls die Aminosäuren 390-420 des GABA_AR- β 2-Loops, wies aber an der Position des Serins 410 ein phosphoryliertes Serin

auf. Aufgrund von technischen Problemen während der Synthese lieferte dies jedoch keine signifikanten Ergebnisse und muss in späteren Versuchen wiederholt werden.

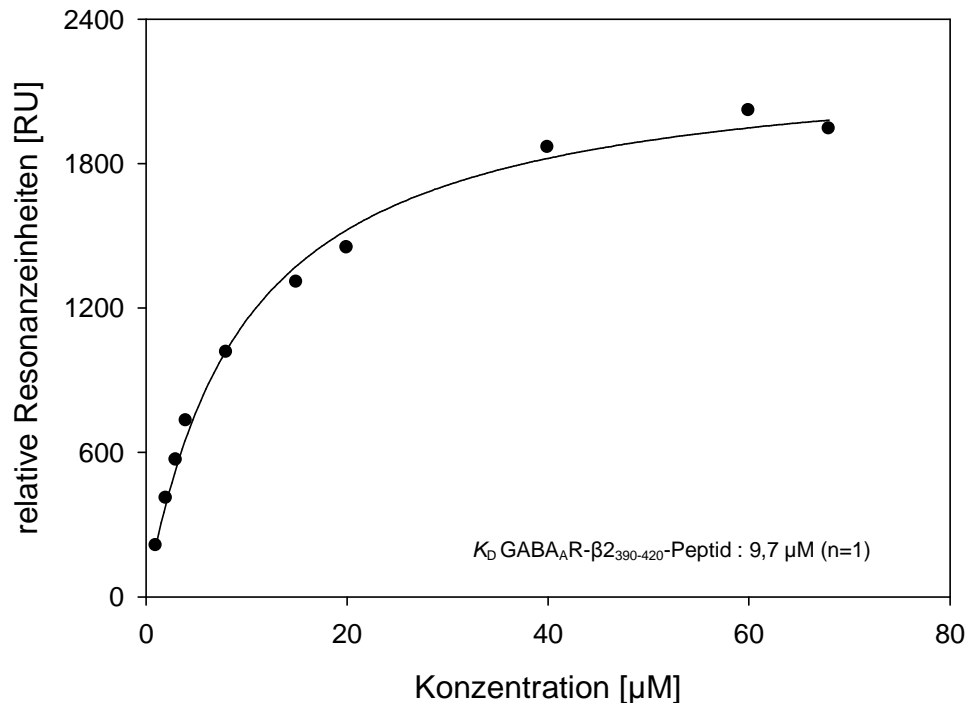


Abb. 2.15: Charakterisierung der Interaktion zwischen einem biotinylierten GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Peptid und Gephyrin mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie. Die SPR-Analysen wurden mit einem biotinylierten Peptid, das die Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA_AR-β₂-Loop trug (Aminosäuren 390-420) und an einen Streptavidin-Chip immobilisiert wurde, durchgeführt. Gephyrin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0-68 μM als Analyt eingesetzt. Der aus der Messung ermittelte K_D -Wert beträgt 9,7 μM. n = Anzahl der Messungen.

2.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen der GABA_AR-γ₂-Untereinheit und Gephyrin

Die GABA_AR-γ₂-Untereinheit ist von wesentlicher Bedeutung für die Funktionalität von GABA_A-Rezeptoren. Sie reguliert die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors sowie den Membrantransport, die Benzodiazepin-Sensitivität und die Lokalisation der Rezeptoren an inhibitorischen Synapsen (Crestani et al., 1999; Essrich et al., 1998). Auch Immunfärbungen von Neuronen aus Gephyrin- (Kneussel et al., 1999) sowie GABA_AR-γ₂-*knock-out*-Mäusen (Essrich et al., 1998) lassen eine Interaktion der beiden Proteine vermuten.

2.3.2 Kosedimentation von Gephyrin mit phosphomimetischen GABA_AR- γ 2-Loops

Um den Effekt der verschiedenen Phosphorylierungsstellen (Abb.16 A) auf die Gephyrin-Bindung an die γ 2-Untereinheit zu ermitteln, wurden verschiedene phosphomimetische Varianten beider Spleiß-Formen erstellt und ebenfalls als GST-Fusionsproteine für Kosedimentationsanalysen eingesetzt (Abb.2.17). Dies wurde teilweise von Smolinsky (2009) bereits durchgeführt, allerdings wurden dort phosphomimetische Mehrfach-Mutanten verwendet, die keinen Effekt auf die Gephyrin-Bindung zeigten. In dieser Studie wurden dagegen die verschiedenen Phosphorylierungsstellen in mehreren phosphomimetischen Varianten einzeln betrachtet.

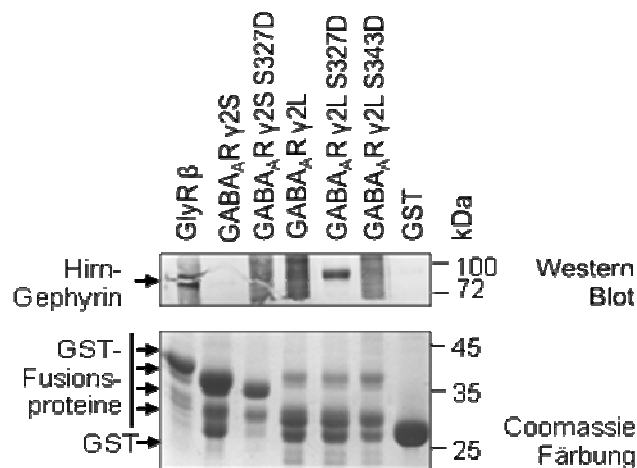


Abb. 2.17: Phosphorylierungs-abhängige Interaktion von GABA_AR- γ 2-Untereinheiten mit Gephyrin. Um einen möglichen Einfluss der verschiedenen bekannten Phosphorylierungsstellen im GABA_AR- γ 2-Loop zu untersuchen, wurden phosphomimetische Varianten des Serin 327 (γ 2S und L) sowie des Serin 343 (γ 2L) für Kosedimentationsanalysen verwendet, um Gephyrin aus Hirn-Rohextrakt zu sedimentieren. Besonders der Einfluss von Serin 327 auf die Gephyrinbindung konnte dadurch für beide γ 2-Spleiß-Varianten gezeigt werden.

Die Kosedimentationen lieferten einen Hinweis darauf, dass eine phosphorylierungs-abhängige Interaktion zwischen dem GABA_AR- γ 2-Loop und Gephyrin vorliegen könnte. Wie schon in Abbildung 2.16 gezeigt, konnte nur eine Interaktion von Gephyrin mit der unmodifizierten γ 2L-, nicht aber der γ 2S-Untereinheit – deren *beads* eine wesentlich höhere Sättigung aufwiesen – gezeigt werden. Allerdings führten vor allem die phosphomimetischen Varianten beider Isoformen zur verstärkten Kosedimentation von Gephyrin, wobei kein eindeutiger Effekt des Serins 343 zu verzeichnen war. Es lag zwar eine Bindung an Gephyrin vor, diese war jedoch vergleichbar mit dem nicht-modifizierten γ 2L-Loop. Die phosphomimetische Variante des Serins 355 zeigte in Vorversuchen keinerlei Effekt und wurde deshalb hier vernachlässigt. Im Vergleich dazu kann ein sehr starker Effekt der

S327D-Variante beider Isoformen auf die Fähigkeit, Gephyrin zu sedimentieren, vermutet werden. Sowohl die phosphomimetische Variante des $\gamma 2S$ -, als auch des $\gamma 2L$ -Loops waren in der Lage, natives Gephyrin in hohem Maße zu sedimentieren, was auf einen möglichen regulatorischen Effekt durch die Phosphorylierung dieses Serins hinweist.

Es ist anzumerken, dass diese Kosedimentationsanalysen ausschließlich mit Hirn-Rohextrakt durchgeführt wurden, daher sind keine genauen Aussagen über eine direkte Interaktion mit Gephyrin möglich. Allerdings scheint es sich aufgrund des Signals, das teilweise stärker ist als für die Positivkontrolle – den GlyR- β -Loop – um eine verhältnismäßig starke Interaktion zu handeln. Zwar ist es auch möglich, indirekte Interaktionen mittels Kosedimentation nachzuweisen, wobei diese im Allgemeinen zu schwächeren Signalen führen als direkte Interaktionen.

Weiterhin ist eine Spleiß-spezifische Bindung des GABA_AR- $\gamma 2$ -Loops an Gephyrin zu vermuten (Abb. 2.16). Die Western Blot-Analyse nach der Kosedimentation zeigt zwei Gephyrin-Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die durch den GlyR- β -Loop sedimentiert wurden. Im Gegensatz dazu ist in den Ansätzen mit GABA_AR- $\gamma 2$ -Loops nur eine Bande zu detektieren. Möglicherweise weist dies auf einen Unterschied in der Gephyrin-Bindung an die verschiedenen Rezeptor-Loops hin. Sowohl für den GABA_AR- $\beta 2$ -, als auch den GlyR- β -Loop konnte keine Spleiß-spezifische Bindung an Gephyrin beobachtet werden (Abb.2.3). Es ist jedoch durchaus denkbar, dass die GABA_AR- $\gamma 2$ -Untereinheit ein unterschiedliches Bindungsverhalten für verschiedene Gephyrin-Varianten aufweist. Genaue Aussagen diesbezüglich könnten durch die Verwendung gereinigter Gephyrin Spleiß-Varianten oder Spleiß-spezifischer Gephyrin-Antikörper gemacht werden.

2.4 Lokalisationsstudien mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten GABA_AR-Loops

Die während der ITC-Messungen mit Gephyrin und dem GABA_AR- $\beta 2$ -Loop (Abb.2.13) beobachteten negativen Effekte der Injektion des Loops in Puffer, ließen vermuten, dass es eventuell zu einer Interaktion innerhalb des Rezeptor-Loops mit sich selbst kommt. Dies wirft wiederum die Frage auf, inwiefern die cytoplasmatischen Loops innerhalb eines assemblierten Pentamers strukturiert bzw. organisiert vorliegen: agiert jeder Loop für sich selbst und interagiert mit definierten Proteinen oder bilden die fünf Loops als Gesamtheit eine gefaltete Struktur, die wiederum die Interaktion mit anderen cytoplasmatischen Proteinen ermöglicht? Ein erster Schritt, um dieser Frage auf den Grund zu gehen, war die

Erstellung unterschiedlicher GABA_AR-Loop Konstrukte. Hierzu wurden die großen intrazellulären Loops der GABA_AR-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 2S$ und $\gamma 2L$ mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen gekoppelt (α : mCherry, β : pEGFP, γ : pCFP) und mittels Einzel-, Ko- bzw. Dreifachtransfektionen in HEK293-Zellen exprimiert. Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts und relativ starken positiven Ladungen lagen die einzeln transfizierten Loops im Kern lokalisiert vor (Abb.2.18 A-C). Die Lokalisierung des GABA_AR- $\gamma 2$ -Loops konnte nicht dargestellt werden, da die Fluoreszenz des CFPs zu schwach war, um die Aufnahme hochwertiger Bilder zu ermöglichen. Da jedoch bei Mehrfachtransfektionen die Wahrscheinlichkeit, dass alle Konstrukte zusammen aufgenommen werden recht hoch ist, ist davon auszugehen, dass bei den Dreifachtransfektionen auch die drei gewünschten Proteine zusammen in einer Zelle exprimiert wurden.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob durch eine mögliche Interaktion der Loops miteinander das Molekulargewicht des Komplexes steigt und eine Kernlokalisierung unterdrückt wird, was jedoch nicht der Fall war (Abb.2.18 D, E). Sowohl nach Doppel-, als auch Dreifachtransfektion war weiterhin eine Anreicherung aller Loops im Zellkern zu beobachten. Die hier gewählten Loop-Kombinationen entsprechen den im Gehirn in großem Maße vertretenen physiologische Kombinationen. Problematisch erwies sich jedoch, dass einige der intrazellulären Loops ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*) – in Form von geclusterten positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin – aufwiesen, was zusätzlich die beobachtete Kernlokalisierung erklärt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil Gephyrin exprimierten, um zu überprüfen, ob möglicherweise die Interaktion der Loops bzw. eines Loops in einem Loop-Komplex mit Gephyrin stärker als das Kernlokalisierungssignal ist es zu einer cytoplasmatischen Anreicherung in den charakteristischen Gephyrin-*blobs* kommt. In Abbildung 2.18 F und G sind exemplarisch die Dreifachtransfektionen dargestellt. Da es sich bei den verwendeten Zellen um eine stabile Gephyrin-Zelllinie handelte, wurde Gephyrin hier nicht zusätzlich angefärbt, sondern nur die Fluoreszenz der verschiedenen Loops detektiert. Exemplarisch sind in Abbildung 2.18 F und G die Ergebnisse für zwei Loop-Kombinationen gezeigt. Die Daten entsprachen den Beobachtungen für die anderen getesteten Variationen und zeigen, dass auch die zusätzliche Expression von Gephyrin die Lokalisation der Rezeptor-Loops nicht ändert.

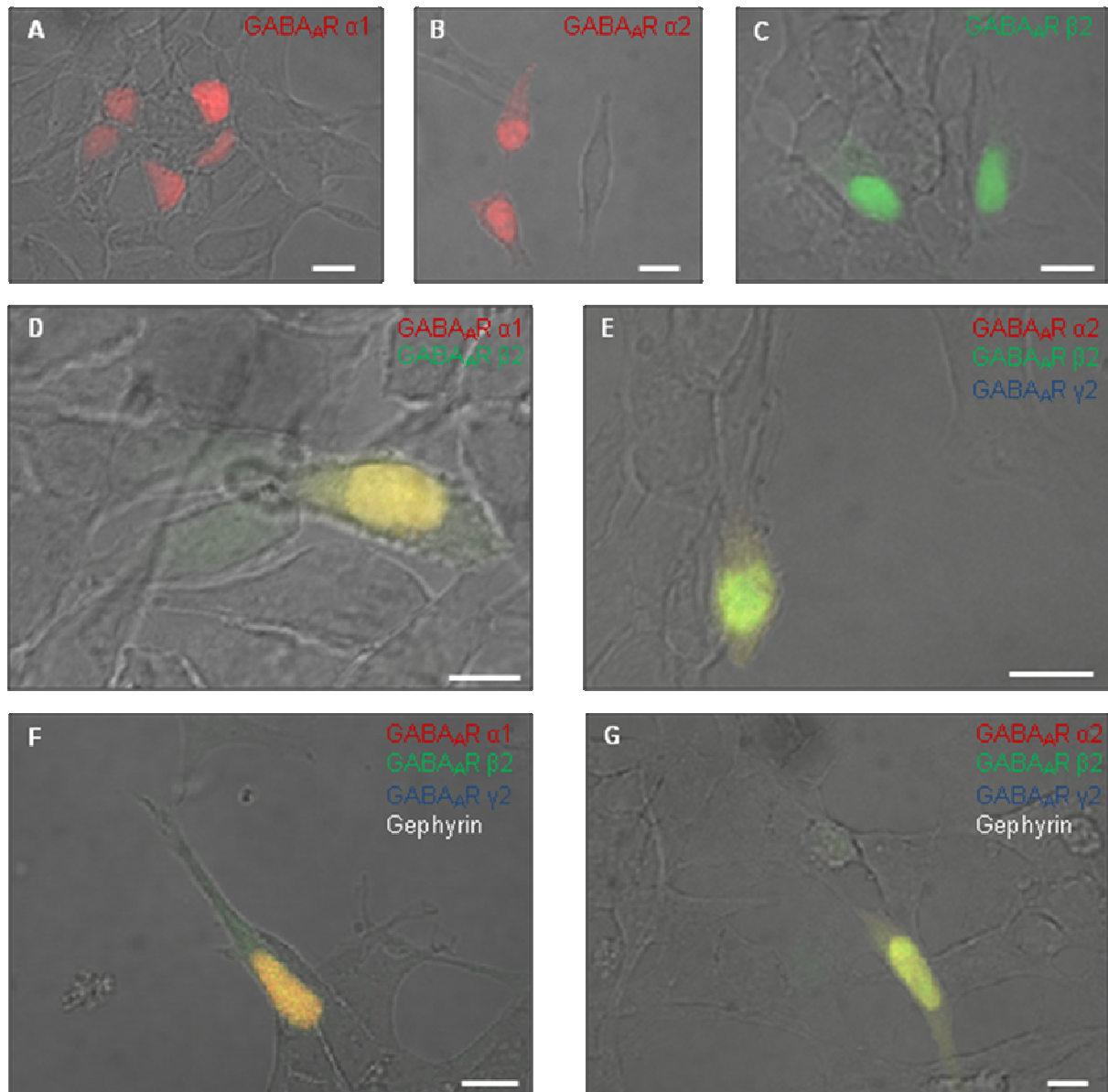


Abb. 2.18: Subzelluläre Lokalisation verschiedener GABA_AR-Loops. Fluoreszenzmarkierte Rezeptor-Loops von charakteristischen GABA_AR-Untereinheiten wurden in HEK293- (A-E) bzw. stabil Gephyrin exprimierenden HEK293-Zellen (F, G) exprimiert. Alle Loops – unabhängig von Einzel-, Doppel- oder Dreifach-Transfektion – sind im Zellkern lokalisiert. Zusätzliche Expression von Gephyrin änderte nichts an dieser Lokalisation. Maßstab: 10 µm.

Die Befunde könnten darauf hin deuten, dass zum einen die Interaktion der Loops mit Gephyrin schwächer ist als das Kernlokalisierungssignal und letzteres somit die treibende Kraft für die Lokalisation der isolierten Rezeptor-Loops ist. Zum anderen liegt möglicherweise keine Interaktion der einzelnen Loops miteinander vor. Sie sind daher weiterhin klein genug, um passiv durch den Kernporenkomplex in den Kern zu diffundieren (Ausschlussgröße 40 – 60 kDa). Daher ist dieses Experiment nicht geeignet, um weitere Einblicke in die

Wechselwirkung von Gephyrin mit GABA_AR-Loops zu erhalten. Es wäre allerdings interessant, in Zukunft zu klären, inwiefern eine mögliche Struktur der fünf intrazellulären Rezeptor Loops zwischen TM3 und 4 in einem funktionellen Pentamer die Funktion des Rezeptors sowie die Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen beeinflusst. Ist somit die Gephyrin-Interaktion mit einem Pentamer nur vom Vorhandensein bestimmter interagierender Untereinheiten oder auch von der Untereinheiten-Zusammensetzung des Rezeptors abhängig? Um dieser Frage nachzugehen sind jedoch weitaus komplexere Experimente, auch im neuronalen Kontext nötig.

3 Diskussion

Die Synaptische Plastizität bezeichnet die Änderung der Konnektivität zwischen zwei Neuronen sowie die Anzahl und Aktivität spezifischer Rezeptorproteine an individuellen Synapsen (Specht und Triller, 2008). Um letzteres zu regulieren, werden cytoplasmatische Proteine benötigt, die eine Verankerung der Rezeptoren in postsynaptischen Bereichen ermöglichen. An exzitatorischen Synapsen werden NMDARs über das PDZ-Domänen enthaltende Protein PSD-95 (Sheng und Sala, 2001) und AMPARs über SAP97 (*synapse associated protein 97*), das in der Lage ist, PSD95 zu binden, stabilisiert (Cai et al., 2006). An inhibitorischen Synapsen wurde die Interaktion zwischen Gephyrin und dem Glycin-Rezeptor bereits im Detail studiert (Kim et al., 2006; Schrader et al., 2004; Sola et al., 2004). Dagegen sind für die in großer Zahl und Vielfalt vorkommenden inhibitorischen GABA_A-Rezeptoren nur wenige Informationen vorhanden. Zwar konnte eine direkte Interaktion dieses Rezeptors über die α 1-3-Untereinheiten mit Gephyrin nachgewiesen werden (Maric et al., 2011; Mukherjee et al., 2011; Saiepour et al., 2010; Tretter et al., 2008; Tretter et al., 2011), jedoch sind die zu Grunde liegenden Mechanismen nicht vollständig verstanden. Des Weiteren wurde die Frage, ob dies die einzigen interagierenden Untereinheiten sind, bisher nicht geklärt.

3.1 Charakterisierung der direkten Interaktion zwischen der GABA_AR- β 2-Untereinheit und Gephyrin

Eine direkte Interaktion von Gephyrin mit den GABA_AR-Untereinheiten β 2, β 3 und δ wurde bereits von Smolinsky (2009) nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung über die E-Domäne des Gephyrins erfolgt und postuliert, dass diese einem anderen Mechanismus, als die Interaktion mit dem GlyR- β -Loop unterliegt. Des Weiteren wurde die Bindungsstelle des Gephyrins innerhalb der GABA_AR- β 2-Untereinheit auf einen N- (Aminosäuren 306-329) sowie C-terminalen (Aminosäuren 401-430) Bereich des intrazellulären Loops eingegrenzt und aufgrund einer Häufung geladener/ polarer Aminosäuren eine ionische Interaktion vermutet (Smolinsky, 2009). Da eine weitere Eingrenzung sowie Charakterisierung dieser Bindung offen blieb, sollte im Rahmen dieser

Arbeit die Interaktion zwischen Gephyrin und Untereinheiten des GABA_ARs mechanisch detailliert untersucht werden.

3.1.1 Direkte Gephyrin-Bindung von GABA_AR-β2 und -β3 über die GlyR-β-Bindetasche

Eine Interaktion von Gephyrin mit den GABA_AR-Untereinheiten β2 und β3 konnte mittels Kosedimentationsanalysen mit GST-fusionierten Rezeptor-Loop-Konstrukten bestätigt werden (Abb.2.2). Auch eine Bindung an die bereits veröffentlichte GABA_AR-α2-Untereinheit (Tretter et al., 2008) als Positivkontrolle sowie eine deutlich schwächere Bindung an die α1-Untereinheit war zu verzeichnen. Neuronale Studien (durchgeführt von Prof. Jochen Meier, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch) mit Chimären aus der GlyR-α1-Untereinheit und dem intrazellulären Loop der verschiedenen GABA_AR-Untereinheiten konnten diese Wechselwirkungen bestätigen. Es war eine starke Interaktion von Gephyrin mit den Untereinheiten α2, α3, β2 und β3 sowie eine geringere Kolo-kalisation mit der GABA_AR-α1-Untereinheit nachweisbar. Des Weiteren zeigten Kosedimentationsanalysen unter Verwendung der Gephyrin-P713E-Variante, die nachweislich nicht in der Lage ist, den GlyR-β-Loop (Kim et al., 2006) sowie die GABA_AR-Untereinheiten-α1 und -α3 (Maric et al., 2011) zu binden, ebenfalls einen Verlust der Interaktion mit den GABA_AR-β2- und -β3-Untereinheiten. Dies konnte ebenfalls im neuronalen Kontext bestätigt werden (Kowalczyk et al., unveröffentlichte Daten). Somit ist zu vermuten, dass die Bindung des GlyR-β-Loops sowie der verschiedenen GABA_AR-Loops an Gephyrin über dieselbe Bindungstasche erfolgt und einem vergleichbaren Mechanismus unterliegt.

Letzteres steht jedoch im direkten Kontrast zu den von Smolinsky (2009) gezeigten Daten, die eine Interaktion mit der P713E-Gephyrin-Variante zeigen. Aufgrund der von Maric und Kollegen (2011) erbrachten Beobachtungen für die GABA_AR-α1- und -α3-Untereinheiten sowie der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse kann jedoch ein allgemeingültiger Bindungsmechanismus für die Untereinheiten der beiden inhibitorischen Rezeptoren angenommen werden.

Die Studien zum GlyR-β-Loop zeigten, dass die linke Wand der Rezeptor-Bindungstasche auf Gephyrin (Aminosäuren 713-719) im homologen, bakteriellen Protein MoeA nicht konserviert ist (Kim et al., 2006; Xiang et al., 2001). MoeA weist anstelle des Prolins 713 ein Glutamat an dieser Position auf. Aufgrund dessen wurde dies als Substitution der in Gephyrin enthaltenden Aminosäure gewählt, um die Notwendigkeit dieser Aminosäure für die Rezeptorbindung zu unterstreichen. Die Strukturdaten für MoeA zeigen, dass dieses Glutamat genau in die Bindungstasche für den GlyR-β-Loop ragt (Kim et al., 2006). Somit

war ein Verlust der Rezeptor-Bindung zu erwarten. Auch ein kompletter Austausch der Aminosäuren 713-721 durch den homologen Bereich aus MoeA führt zu einem Verlust der Gephyrin-GlyR- β -Bindung (Sola et al., 2004). Aufgrund der konsistenten Daten für die Gephyrin-P713E-Variante wäre ein entsprechender Effekt für die Gephyrin-GABA_AR-Interaktion ebenfalls zu erwarten, wenn diese derselben Bindungstasche bedarf. Des Weiteren spricht für eine gemeinsame Bindungsstelle, dass die für die Rezeptor-Interaktion essentiellen Reste nur in Vertebraten hochkonserviert vorliegen und nicht in homologen Proteinen, die keine derartige Wechselwirkung mit Neurotransmitter-Rezeptoren eingehen müssen. Der Austausch der Aminosäure an diesen Positionen hat jedoch keine Auswirkung auf die Faltung/ Aggregation oder das aktive Zentrum der jeweiligen Proteine (Xiang et al., 2001), was diesem Bereich der E-Domäne eine ausschließliche Funktion in der Rezeptor-Bindung und damit seiner neuronalen Funktion zukommen lässt. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese einer gemeinsamen Rezeptor-Bindestelle innerhalb des Gephyrins, die sowohl für die GlyR- β -, als auch die verschiedenen GABA_AR-Untereinheiten gültig ist. Auch eine Stabilisierung der Konformation der gebundenen Rezeptor-Loops durch die Interaktion mit der aromatischen Aminosäure an Position 713 wäre denkbar.

GABA_A- und Glycin-Rezeptoren treten auch an gemischten Synapsen auf, wo sie beide über Gephyrin geclustert werden. Daher ist es äußerst wahrscheinlich, dass sich die Bindungstaschen nicht unterscheiden, damit eine leichte und effiziente Bindung möglich ist. Außerdem ist es vorstellbar, dass die Gephyrin-Faltung sowie -Ausrichtung innerhalb des cytoplasmatischen Netzwerkes keine Bindung über andere Reste außerhalb dieser Bindungstasche erlaubt. Bisher ist zwar nicht endgültig geklärt, wie das Gephyrin-Netzwerk unterhalb der postsynaptischen Membran organisiert ist, aber es wird eine Aggregation auf der Basis von Gephyrin-Trimeren als kleinste Einheit dieses Netzwerkes vermutet (Fritschy et al., 2008). Es ist anzunehmen, dass diese für eine effiziente Rezeptor-Bindung in einem definierten Abstand zur Plasmamembran ausgerichtet sein müssen, was vermutlich über weitere Interaktionspartner wie beispielsweise Neuroligin 2 und Collybistin reguliert wird.

Im direkten Vergleich der Aminosäure-Anzahl der verschiedenen Rezeptor-Loops ähneln sich die β -Loops der beiden Rezeptor-Typen sehr stark. So ist der GlyR- β -Loop mit 127 Aminosäuren nur unwesentlich länger als der GABA_AR- β 2- (125 Aminosäuren) bzw. - β 3-Loop (123 Aminosäuren). Die GABA_AR- α -Untereinheiten, die ebenfalls Gephyrin binden, sind dagegen wesentlich kürzer und setzen sich nur aus 83 (α 1), 85 (α 2) bzw. 93 (α 3) Aminosäuren zusammen. Somit ist ein Unterschied im Bindungsverhalten an Gephyrin aufgrund der Länge des intrazellulären Loops nicht zu erwarten, zumal die nicht mit Gephyrin

interagierenden GlyR- α -Loops ebenfalls eine geringere Anzahl an Aminosäuren aufweisen, was lediglich auf Gemeinsamkeiten der verschiedenen Unterklassen hindeutet.

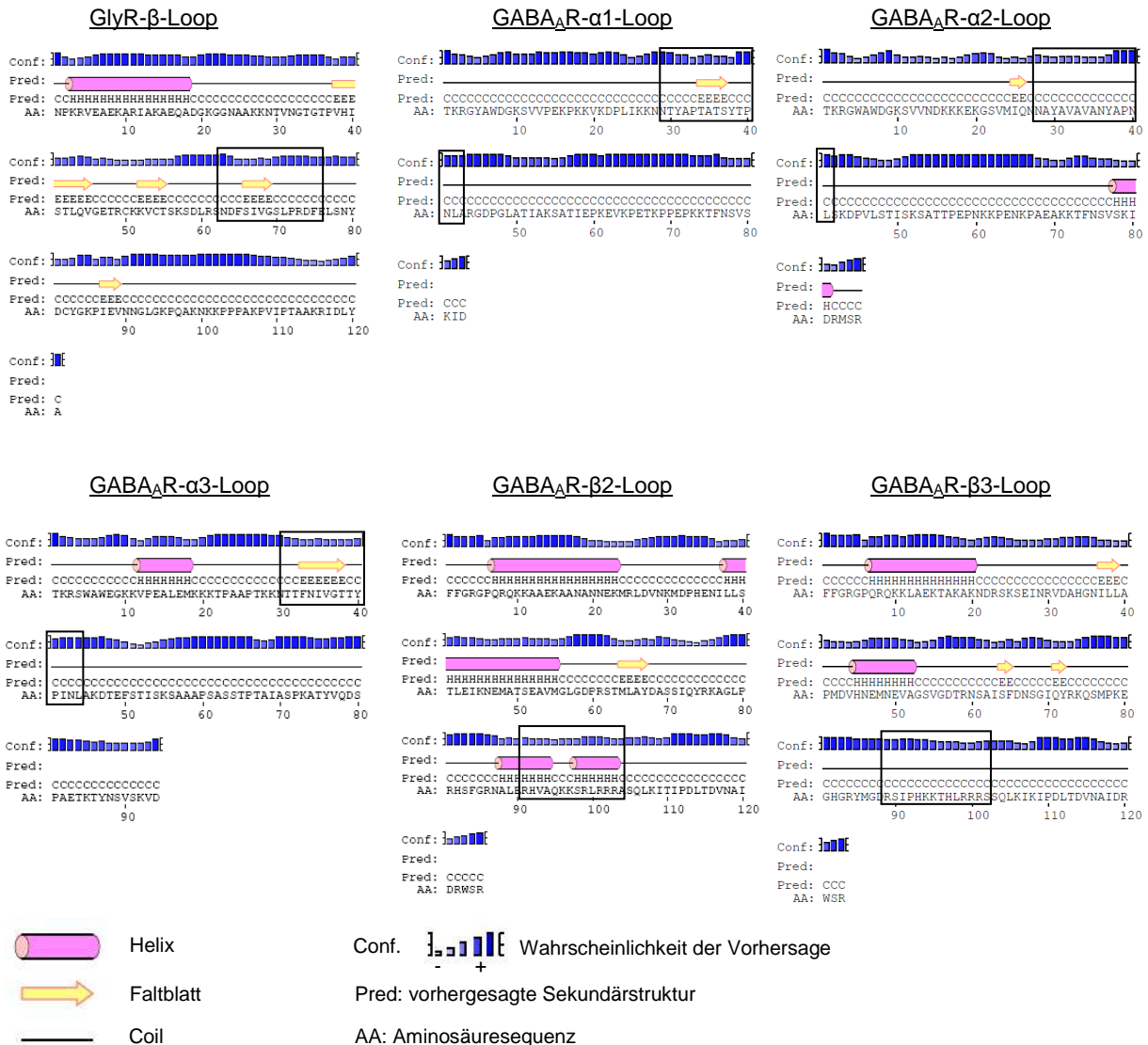


Abb.3.1: Strukturvorhersage für die intrazellulären Loops der GlyR- β - sowie GABA_AR- α 1-3- und - β 2/3-Untereinheiten. Die Vorhersage wurde mittels <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/ffpred/> durchgeführt und ist hier exemplarisch für die drei Untereinheiten dargestellt. Die jeweiligen Gephyrinbindungsstellen sind markiert (schwarzer Rahmen).

Möglicherweise kommt es aber zu einer unterschiedlichen Faltung der Loops innerhalb des Pentamers, so dass eine Bindung über dieselbe Bindungsstelle ermöglicht wird. Strukturvorhersagen (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/ffpred/>) für die intrazellulären Loops der einzelnen Untereinheiten (Abb.3.1) ergaben eine relativ ungeordnete Struktur für die α -Untereinheiten. Sie enthalten wenige bzw. sehr kurze Sequenzen, in denen Helices oder Faltblätter vermutet werden können. Dabei ist auffällig, dass bei der α 1- und α 3-Untereinheit

innerhalb der Gephyrin-Bindestelle ein Faltblatt vorhergesagt wird, wohingegen dieses topologisch verwandte Faltblatt in der $\alpha 2$ -Untereinheit in der direkten Umgebung der Bindestelle lokalisiert ist.

Die wesentlich längeren GABA_AR- $\beta 2$ - und - $\beta 3$ -Loops sowie der GlyR- β -Loop weisen weitere Parallelen auf. Sie setzen sich aus verschiedenen Helices und Faltblättern zusammen, die jedoch nicht verwandt zu sein scheinen, weshalb die Gephyrin-Bindestelle in den drei Untereinheiten nicht vergleichbar ist. So weist die GlyR- β -Untereinheit laut Vorhersage in der Gephyrin-Bindestelle ein Faltblatt auf, während für die GABA_AR- $\beta 2$ - eine Helix und für die - $\beta 3$ -Untereinheit eine unstrukturierte Region vorhergesagt wird. Aus Kokristallisationsstudien mit dem GlyR- β -Loop und Gephyrin geht jedoch hervor, dass im Bereich der Gephyrinbindestelle (Aminosäuren 406-410 des GlyR- β -Loops) eine Sekundärstruktur in Form einer kurzen 3_{10} -Helix gebildet wird (Kim et al., 2006). Allerdings wurde bei Kim und Kollegen nur der Bereich 378-426 für die Kristallisationsstudien eingesetzt, während für die Strukturvorhersage der gesamte Loop verwendet wurde.

Die Strukturvorhersagen können als Anhaltspunkte für einen Vergleich der Loop-Strukturen untereinander dienen. Dabei ist zu beachten, dass die intrazellulären Loops im *holo*-Rezeptor mit den Transmembrandomänen verbunden sind und zusätzlichen sterischen Hindernissen ausgesetzt sind, die eine veränderte Struktur im funktionellen Pentamer bewirken können. Somit scheint weder die Anzahl der Aminosäuren, noch die Struktur des Loops innerhalb der Gephyrin-Bindungsstelle allein ausschlaggebend für die Interaktion zu sein. Möglicherweise liegen die Loops im Pentamer als gefaltete Strukturen vor, so dass die Faltung darüber entscheidet, welche Motive eine Bindung mit cytoplasmatischen Proteinen wie Gephyrin eingehen können. Die Bindestellen befinden sich zwar jeweils in unterschiedlichen Regionen des Loops, allerdings könnte es möglich sein, dass die übrigen Aminosäuren des Loops die Interaktion mit Gephyrin behindern, wenn sie nicht in einer bestimmten Faltung vorliegen bzw. einen bestimmten Abstand zum Gephyrin-Netzwerk aufweisen. Interessant dabei ist, dass die Bindestellen innerhalb der α -Loops N-terminal lokalisiert sind, während sie in den β -Untereinheiten in C-terminalen Bereichen nachgewiesen wurden. Im GlyR- β -Loop liegt das Bindungsmotiv dagegen in der Mitte der Loop-Sequenz. Auch in dieser Hinsicht sind somit keine Parallelen zu ziehen. Möglicherweise ist eine fehlende Faltung bzw. Gemeinsamkeiten in der Loop-Struktur ein Hinweis darauf, dass die Loops in alle Richtungen zeigen und dadurch die Interaktion zwischen der Plasmamembran, Gephyrin und den GABA_ARs flexibel moduliert wird. Durch die Flexibilität in der Loop-Struktur, wäre allerdings ein starrer in die Zelle hineinragender Loop ausgeschlossen. Da jedoch die meisten Proteine einer strukturierten Faltung

unterliegen ist ein starrer Loop unterhalb der Plasmamembran, in dem nur bestimmte Motive Interaktionen mit den Bindungspartnern eingehen können zu favorisieren.

Im direkten Vergleich der Aminosäuresequenz der verschiedenen Gephyrin-interagierenden Rezeptor-Untereinheiten, innerhalb des Bindungsmotivs, besteht ausschließlich zwischen den jeweiligen α - und β -Subvarianten eine hohe Sequenz-homologie. Dabei sind die Bindestellen der GABA_AR- α 1-3-Untereinheiten und des GlyR- β -Loops hydrophob und bilden wahrscheinlich vergleichbar hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des Gephyrins aus. Im Gegensatz dazu lassen die zahlreichen geladenen/ polaren Aminosäuren der β 2/3-Untereinheiten eine ionische Interaktion vermuten. Allerdings kann durch die funktionelle Bedeutung des Prolins 713 in der Gephyrin E-Domäne davon ausgegangen werden, dass zumindest eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen den GABA_AR- β -Loops und Gephyrin eingegangen wird. Welche Aminosäure dafür auf der Seite des Rezeptor-Loops ausschlaggebend ist, wurde bisher noch nicht analysiert.

GlyR-beta	NDFSIVGSLRDFE
GABAAR-alpha1	NTYAPTATSYTPNL
GABAAR-alpha2	NAYAVAVANYAPNL
GABAAR-alpha3	TTFNIVGTTYPINL
GABAAR-beta2	ERHVAQKKSRLRRR
GABAAR-beta3	DRSIPHKKTHLRRR

Abb.3.2: Alignment der Gephyrinbindestellen innerhalb der GlyR- β -, GABA_AR- α 1-3- und - β 2/3-Untereinheit. Dargestellt sind die minimalen Bindemotive der jeweiligen Untereinheiten, die in dieser Arbeit (GABA_AR- β 2/3) oder früheren Studien (Schrader et al., 2004; Maric et al., 2011) genauer charakterisiert wurden. Es ist keine Homologie der Sequenzen untereinander erkennbar. Ausschließlich das Isoleucin 400 der GlyR- β -Untereinheit weist eine geringe Konservierung in den übrigen Untereinheiten auf. Die Reste Serin 403, Leucin 404 und Prolin 405 des GlyR- β -Loops (roter Kasten) stehen in engem Kontakt mit dem Prolin 713 des Gephyrins (Kim et al., 2006). Rot: gering konserviert; grau: neutral.

Ein Vergleich der GlyR- β - und GABA_AR- α 3-Untereinheit im Bereich der Gephyrin-Bindestelle zeigte eine konservierte Kernsequenz („FSIV“ bzw. „FNIV“). Ein direkter Vergleich der minimalen Bindestellen aller Gephyrin-bindenden Untereinheiten deutet dagegen auf keine Homologie hin (Abb.3.2). Ausschließlich das Isoleucin 400 der GlyR- β -Untereinheit weist eine geringe Konservierung auf. Abgesehen von der GABA_AR- α 1-Untereinheit ist an dieser Position entweder ein unpolares Isoleucin oder Valin, das sich ausschließlich durch ein weiteres C-Atom in der Kohlenstoffkette vom Isoleucin unterscheidet, vertreten. Das Isoleucin 400 weist eine entscheidende Rolle in der Interaktion des GlyR- β -Loops mit Gephyrin auf und ist ausschlaggebend für die hydrophobe Interaktion mit dem Phenylalanin 330 des Gephyrins (Abb.1.8). Da die Mutation dieses Phenylalanins die Bindung zum GlyR- β -Loop (Kim et al., 2006) sowie zu den GABA_AR-Untereinheiten α 1

und $\alpha 3$ (Maric et al., 2011) nahezu zerstört, unterstützt dieser Befund gemeinsam mit den Versuchen der P713E-Variante des Gephyrins einen identischen Bindemechanismus zwischen den verschiedenen Rezeptor-Loops und Gephyrin. Vermutlich trifft dies ebenfalls auf die GABA_AR-Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 3$ zu, was für eine weitere hydrophobe Wechselwirkung dieser Untereinheiten mit Gephyrin sprechen würde. Eine Kristallstruktur würde Aufschluss darüber geben, welche interagierenden Reste an der Interaktion beteiligt sind, um welche Art von Bindung es sich handelt und ob die GABA_AR-Loops ebenfalls eine C-förmige Struktur bilden, die eine Gephyrin-Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip – wie es für den GlyR- β -Loop gezeigt wurde (Kim et al., 2006) – ermöglicht.

Um einen möglichen Einfluss verschiedener Gephyrin Spleiß-Varianten auf die GABA_AR- $\beta 2$ -Interaktion mit Gephyrin zu analysieren, wurden Kosedimentationsanalysen mit den Isoformen Geph, Geph-C3 und Geph-C4c durchgeführt (Abb.2.3). Sowohl der GlyR- β -, als auch der GABA_AR- $\beta 2$ -Loop banden an alle getesteten Varianten. Dies war zu erwarten, da es sich bei den verwendeten Isoformen ausschließlich um Veränderungen in der C-Domäne handelt. Da für die Bindung die Gephyrin E-Domäne ausreichend ist, sollten zusätzliche Spleiß-Kassetten in der C-Domäne keinen direkten Einfluss auf die Interaktion haben. Für den GlyR- β -Loop wurde allerdings nachgewiesen, dass die Geph-C3-Variante verglichen mit Geph und Geph-C4c eine wesentlich geringere Affinität zum intrazellulären GlyR- β -Loop sowie ein verändertes Bindungsverhalten aufweist (Herweg und Schwarz, 2012). Dies könnte aufgrund derselben Bindungstasche auch für die GABA_AR- $\beta 2$ -Gephyrin-Interaktion zutreffen. Die hier durchgeführten Kosedimentationsanalysen zeigten jedoch diesbezüglich keinen signifikanten Effekt. Kosedimentationen stellen aufgrund hoher Schwankungen in der Saturierung der *beads* und einer im Vergleich zu ITC-Messungen geringen Sensitivität keine geeignete Methode zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten dar. Es konnte somit mittels Kosedimentation sowohl für den GlyR- β - als auch den GABA_AR- $\beta 2$ -Loop lediglich eine potentielle Bindung an alle getesteten Spleiß-Varianten nachgewiesen werden. Für genauere Aussagen ist jedoch eine weiterführende biophysikalische Charakterisierung notwendig. Trotz der Lokalisation der Bindungstasche in der Gephyrin E-Domäne kann somit zu diesem Zeitpunkt ein Einfluss der C-Domäne auf die Bindung des GABA_ARs weder ein- noch ausgeschlossen werden. Ein regulatorischer sowie konformationeller Einfluss dieser Gephyrin-Domäne auf die Interaktion wäre durchaus denkbar. Beispielsweise führt die phosphorylierungs-abhängige Bindung von Pin1 an die Gephyrin C-Domäne zu einer Konformationsänderung des Gephyrins, die die Bindung an den GlyR- β -Loop verstärkt (Zita et al., 2007). Somit kommt es zu einer indirekten Beeinflussung der Interaktion durch die C-Domäne.

Da die C3-Variante hauptsächlich in der Leber oder im Gehirn in Gliazellen vorzufinden ist, wurde ihr eine Bedeutung in der Moco-Biosynthese zugeschrieben (Smolinsky et al., 2008), während die C4-Isoform eine erhöhte neuronale Anreicherung aufweist und vorherrschend mit dem GlyR- β -Loop kopräzipitiert wurde (Paarmann et al., 2006). Von Herweg und Schwarz (2012) wurde nachgewiesen, dass die C-Domäne einen Effekt auf die Oligomerisierung ausübt. Dies wurde für die C3-Variante bestätigt. Möglicherweise wird durch die geänderte Faltung des Proteins die Rezeptor-Bindetasche maskiert, um die für die Moco-Biosynthese notwendigen Bereiche zugänglich zu machen. Somit kann vermutet werden, dass der Oligomerisierungsstatus des Gephyrins sowie die daraus resultierende Konformation einzelner Aminosäuren ausschlaggebend für eine Bindung inhibitorischer Rezeptoren sind. Dies wurde durch Studien mit Sf9-Gephyrin unterstrichen, die bei gesteigerter Oligomerisierung eine erhöhte Rezeptorbindung aufwiesen (Herweg und Schwarz, 2012).

Neben der Konformation bzw. des Oligomerisierungszustandes eines Proteins können auch posttranslationale Modifikationen die Wechselwirkung mit anderen Proteinen beeinflussen. Da vor allem in der C4-Variante spezifische Phosphorylierungsstellen nachgewiesen wurden, wird eine Spleiß-spezifische Regulation von Gephyrin vermutet (Herweg und Schwarz, 2012). In weiterführenden biophysikalischen sowie neuronalen Experimenten könnte ein direkter oder indirekter Einfluss dieser Phosphorylierungsstellen auf die Rezeptorbindung analysiert werden. Für weitere Einblicke sollten die von Herweg (2012) durchgeführten Messungen mit den verschiedenen Gephyrin Spleiß-Varianten und dem GlyR- β -Loop auch mit den GABA_AR- α 1-3- sowie - β 2/3-Loops durchgeführt und untereinander verglichen werden. Nur diese Experimente können detailliertere Aussagen über den Einfluss der C-Domänen-Insertionen auf die Rezeptor-Gephyrin-Interaktion liefern.

3.1.2 Identifizierung der Gephyrin-Bindestelle auf dem GABA_AR- β 2-Loop

Mittels trunkierter Loop-Varianten konnte die Gephyrin-Bindestelle auf den C-Terminus des GABA_AR- β 2-Loops eingeschränkt werden (Abb.2.4). Dabei ergab sich ein minimales Bindungsmotiv für die Aminosäuren 396-408, wohingegen die stärkste Gephyrin-Bindung für den Bereich der Aminosäuren 390-420 zu beobachten war. Das Alignment der GABA_AR- β 2-Untereinheiten aus verschiedenen Organismen zeigt eine sehr hohe Homologie (Abb.3.3). Lediglich innerhalb der extrazellulären Domäne sowie des intrazellulären Loops zwischen den Transmembrandomänen drei und vier ergeben sich geringfügige Unterschiede vor allem für *B. taurus* und *M. mulatta*. Die Gephyrinbindestelle ist dagegen in allen betrachteten Organismen hoch konserviert.

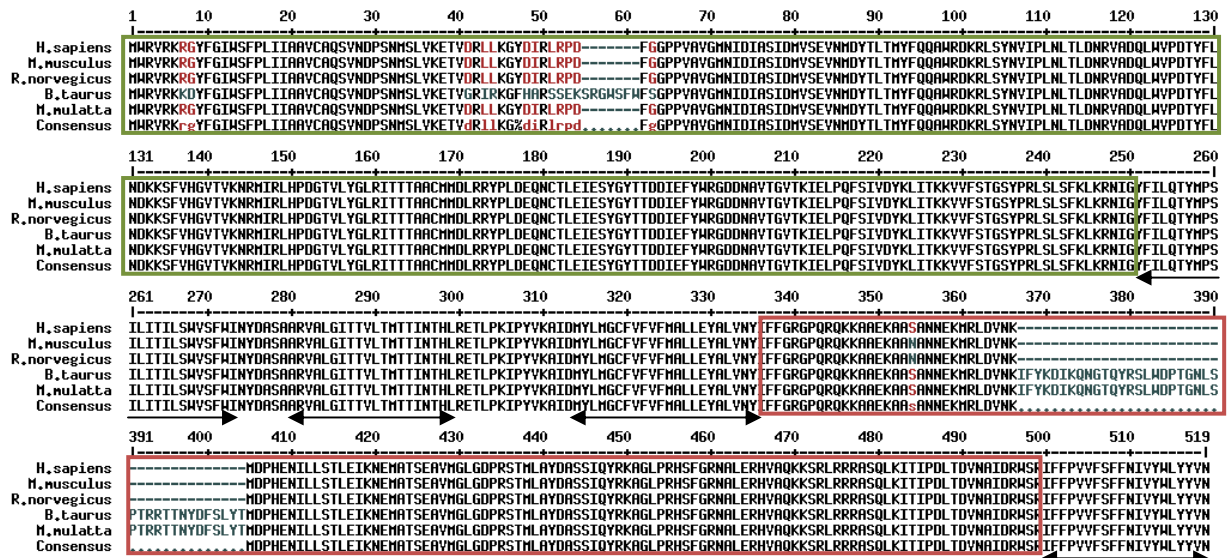


Abb.3.3: Alignment von GABA_A-β₂-Untereinheiten aus verschiedenen Organismen. Die GABA_A-β₂-Untereinheiten aus Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Rind (*Bos taurus*) und Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) zeigen sehr hohe Homologien untereinander. Lediglich in der extrazellulären Domäne (grüner Kasten) und im großen intrazellulären Loop (roter Kasten) zwischen den Transmembrandomänen (Pfeil) drei und vier weisen geringfügige Unterschiede auf. Der Bereich der Gephyrinbindestelle ist in allen Organismen hoch konserviert: hoch konserviert; rot: gering konserviert; grau: neutral.

Die hier gezeigten Ergebnisse bezüglich der Gephyrin-Bindestelle innerhalb des GABA_A-β₂-Loops entsprechen nur teilweise schon im Vorfeld durchgeführten Studien. Smolinsky zeigte bereits 2009 eine Gephyrin-Bindung für die Bereiche 306-329 sowie 401-430 des GABA_A-β₂-Loops. Es wurde dabei eine verstärkte Bindung an den C-terminalen Teil des Rezeptor-Loops beobachtet (Smolinsky, 2009), was den hier gezeigten Ergebnissen entspricht und durch eine systematische Untersuchung von trunkierten Rezeptor-Loop-Fragmenten verifiziert und näher eingegrenzt werden konnte. Die Bindung an den N-terminalen Teil des Rezeptor-Loops war dagegen wesentlich schwächer (Smolinsky, 2009), was möglicherweise auf ein Artefakt hindeutet und daher vernachlässigt wurde. Gleichzeitig konnten durch Studien von Prof. Jochen Meier (MDC Berlin-Buch) die Ergebnisse der Kosedimentations-Analyse durch Versuche in neuronalem Kontext bestätigt werden. Es wurden Chimären aus Fragmenten des GABA_A-β₂-Loops und der GlyR-α₁-Untereinheit, die nicht fähig ist, mit Gephyrin zu interagieren, verwendet und mit GFP-fusioniertem Gephyrin koexprimiert und Kolokalisationsstudien unterzogen (Kowalczyk et al., unveröffentlichte Daten). Aufgrund eines Arginin-Clusters im Bereich der Aminosäuren 390-420 konnte dieses Fragment für neuronale Studien nicht verwendet werden, da es in einer von der Gephyrin-Expression unabhängigen intrazellulären Lokalisation in proximal

somatodendritischer Region resultierte. Da aber in Kosedimentationsanalysen auch die verkürzten Varianten dieser Sequenz Gephyrinbindung aufwiesen, wurden diese eingesetzt und es konnte eine Lokalisation der Chimären in distalen Plasmamembran Kompartimenten der Dendriten mit erhöhter Koloakalisation mit Gephyrin gezeigt werden, was die biochemischen Daten bestätigt (Kowalczyk et al., unveröffentlichte Daten).

Aufgrund der verstärkten Bindung bei einer Verlängerung des Motivs auf die Aminosäuren 390-420 ist eine regulative Funktion vor allem der Aminosäuren 409-420, die außerhalb der minimalen Bindesequenz liegen, zu vermuten. Interessanterweise befindet sich im Bereich der Aminosäuren 402-413 ein in allen β -Untereinheiten konserviertes atypisches AP2-Bindemotiv (Kittler et al., 2005) sowie eine Phosphorylierungsstelle am Serin 410 (zusammengefasst in Luscher et al., 2011). Liegt das Serin unphosphoryliert vor, so kommt es zur Bindung des AP2-Komplexes über dessen μ 2-Untereinheit und zur Internalisierung des Rezeptors. Dies wurde für die β 3-Untereinheit bestätigt und wird aufgrund der hohen Sequenzhomologie innerhalb der β -Untereinheiten (Abb.3.5) in diesem Bereich auch für die β 2-Untereinheit vermutet. Da der AP2-Komplex eine gegensätzliche Funktion zur Gephyrin-vermittelten Rezeptor-Clusterung an der Synapse darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich möglicherweise um eine wechselseitige, phosphorylierungs-abhängige Regulation beider Mechanismen handelt.

Kosedimentationsanalysen mit einer phosphomimetischen Variante des GABA_AR- β 2-Loops an Position 410 sollten erste Hinweise auf eine phosphorylierungs-abhängige Gephyrin-Bindung liefern. Im Vergleich zum unmodifizierten Loop war eine wesentlich stärkere Gephyrin-Interaktion mit der phosphomimetischen sowie eine deutlich schwächere Bindung von Gephyrin an die Alanin-Variante, die einen nicht-phosphorylierten Loop widerspiegelt, zu verzeichnen. SPR-Messungen mit einem Phospho- sowie nicht-Phospho-Peptid (Aminosäuren 390-420) konnten jedoch keinen weiteren Aufschluss über einen möglichen Effekt der Phosphorylierung an Position 410 liefern, was aber im wesentlichen auf technische Probleme bei der Peptid-Synthese zurück zu führen war und in späteren Analysen weiter verfolgt werden sollte.

Basierend auf den Kosedimentationsdaten der phosphomimetischen Varianten kann vermutet werden, dass Gephyrin an den phosphorylierten GABA_AR- β 2-Loop mit hoher Affinität bindet und den Rezeptor an der Synapse stabilisiert. Kommt es zur Dephosphorylierung des Loops durch PRIP und PP1 α bzw. PP2A (Terunuma et al., 2004), sinkt die Affinität von Gephyrin zur β 2-Untereinheit. Dies führt zur Auflösung der durch Gephyrin vermittelten Rezeptor-Cluster und zur lateralen Diffusion des β 2-enthaltenden GABA_A-Rezeptors in extrasynaptische Bereiche. Zusätzlich erhöht die Dephosphorylierung

die Affinität der $\beta 2$ -Untereinheit zur $\mu 2$ -Untereinheit des AP2-Komplexes, der in extrasynaptischen Bereichen an den Rezeptor-Loop bindet und die Clathrin-vermittelte Endocytose des Rezeptors induziert (Abb.3.4). So kann die Phosphorylierung des Serins 410 als molekularer Schalter zur Regulation des Equilibriums zwischen Rezeptor-Clusterung und -Internalisierung dienen und könnte somit auch die Anzahl der Rezeptoren in synaptischen Bereichen der Plasmamembran regulieren. Der Transport aus synaptischen in extrasynaptische Bereiche erfolgt dabei wahrscheinlich über das Transportprotein Muskelin, das mit der GABA_AR- $\alpha 1$ -Untereinheit interagiert (Heisler et al., 2011). Die Bindestelle im intrazellulären Loop (Reste 399-420) liegt dabei außerhalb des für diese Untereinheit postulierten Gephyrin-Bindemotivs (Reste 360-375; Maric et al., 2011). Es ist jedoch bisher nicht geklärt, welche regulatorischen Mechanismen diesem Transport zu Grunde liegen. Muskelin vermittelt nach Internalisierung den Weitertransport zum Lysosom. Recycling über HAP1 führt dagegen zum Wiedereinbau der Rezeptoren in die Plasmamembran (Kittler et al., 2004), wodurch die regulierte Endocytose einen Mechanismus zur Kontrolle des Equilibriums zwischen GABA_AR-Recycling und -Neusynthese liefert (Barnes, 1996).

Mehrere Studien zeigten bisher, dass verschiedene Kinasen an der Phosphorylierung des Serins 410 beteiligt sind. Es konnte die Phosphorylierung durch die PKC (Brandon et al., 2003; McDonald et al., 1998), die CaMKII (McDonald und Moss, 1994) und die Akt-Kinase (Wang et al., 2003) nachgewiesen werden. Die initialen Versuche zum Nachweis einer phosphorylierungs-abhängigen Internalisierung der GABA_AR- $\beta 2$ Untereinheiten wurden mit der PKC bzw. PKA (im Falle der $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Untereinheit) durchgeführt, was eine Beteiligung dieser Kinasen an dem zu Grunde liegenden Mechanismus vermuten lässt (Kittler et al., 2005). Da es sich hierbei allerdings um *in vitro* Studien handelt, ist eine genaue Aussage diesbezüglich nicht möglich. Im Falle der Akt-Kinase kann eine Beteiligung an dem hier beschriebenen Mechanismus der Clathrin-abhängigen Internalisierung ausgeschlossen werden (Fuji et al., 2010). Diese Serin/Threonin-Kinase ist primäres Ziel des Insulin-Signalweges *downstream* der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Wang et al., 2003). Die Insulin-induzierte Akt-vermittelte Phosphorylierung führt zu einer Translokation von GABA_ARs zur Zelloberfläche und zu einem schnellen Anstieg der postsynaptischen GABA_ARs. Eine Beteiligung von Gephyrin an diesem Mechanismus konnte bisher nicht gezeigt werden, es ist aber zu vermuten, dass die verstärkte postsynaptische Akkumulation durch Gephyrin-vermittelte Clusterung der Rezeptoren induziert wird. Somit führt die Phosphorylierung des Serins 410 abhängig von der beteiligten Kinase zu unterschiedlichen Effekten, was die Komplexität der zellulären Regulationsmechanismen unterstreicht.

Möglicherweise hat auch das zelluläre Kompartiment einen entscheidenden Einfluss auf die Auswirkungen der Phosphorylierung (Luscher et al., 2011).

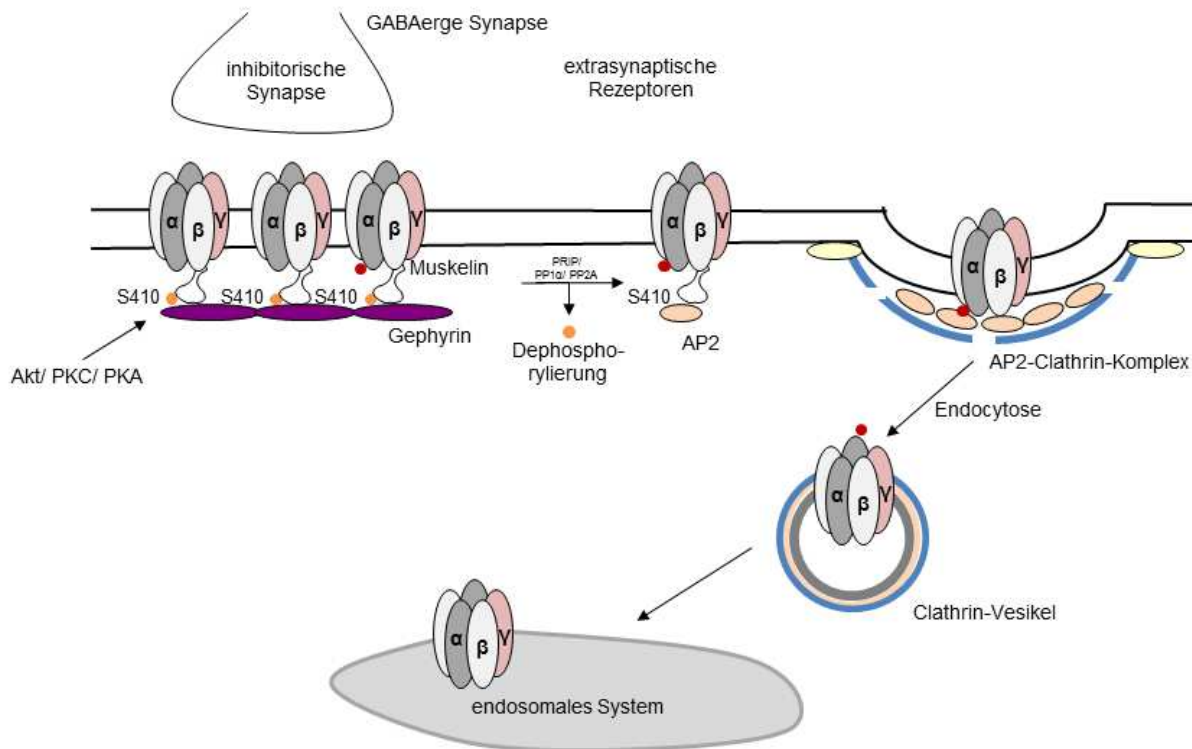


Abb.3.4: Hypothese zur Phosphorylierungs-abhängigen Regulation der Clusterung und Internalisierung von GABA_AR-β2-Untereinheiten. Das Serin 410 der GABA_AR-β2-Untereinheit kann durch die Kinasen Akt, PKC oder PKA phosphoryliert werden (zusammengefasst in Luscher et al., 2011), wodurch vermutlich ihre Affinität zu Gephyrin erhöht wird (diese Arbeit). Durch die Dephosphorylierung kommt es zur Auflösung der synaptischen GABA_AR-Cluster, was in verminderter Gephyrin-Bindung resultiert – und die Affinität der β2-Untereinheit gegenüber der μ2-Untereinheit des AP2-Komplexes erhöht, wodurch die Internalisierung des Rezeptors erfolgt (Kittler et al., 2005).

Zur weiteren Charakterisierung der Phosphorylierungs-abhängigen Gephyrin-GABA_AR-Interaktion wurden *in vitro* Phosphorylierungsstudien durchgeführt (Abb.2.5). Die potentiell phosphorylierten Rezeptor-Loops (β2-S410, β2-S410A, β2-S410D) zeigten keinen sichtbaren Effekt im Vergleich der Bindungsstärken an Gephyrin, was auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein könnte. Zum einen könnte kein Phosphorylierungs-abhängiger Effekt auf die Bindung vorliegen, wogegen allerdings die zuvor durchgeführten Kosedimentationen sprechen. Des Weiteren können die Reaktionsbedingungen für die Kinasen nicht ideal gewesen sein, so dass sie nicht in der Lage waren, das Substrat zu phosphorylieren. Speziell PKCs benötigen eine komplexe Pufferzusammensetzung, in der zusätzlich die genaue Konzentration der Lipide, welche für die Aktivierung notwendig sind, vorhanden sein muss. Außerdem wurden in dieser Arbeit nur drei der 12 bekannten

Isoformen der verschiedenen PKC-Klassen (Rosse et al., 2010) verwendet. Daher könnte eine Erklärung für den ausbleibenden Effekt sein, dass eine andere Isoform spezifisch für die Phosphorylierung des Serins 410 ist und die einzelnen Isoformen sich nicht in ihrer Funktion komplementieren können.

Zusätzlich wurden *in vitro* Phosphorylierungs-Studien unter Einsatz von Hirn-Rohextrakt mit ATP im Überschuss sowie Magnesium-Ionen als Cosubstrat durchgeführt (Abb.2.6). Der verwendete Hirnextrakt enthält alle im Gehirn vertretenen Kinasen, wodurch eine physiologische Phosphorylierung des Serin-Restes prinzipiell ermöglicht werden sollte. Als Ergebnis war ein Phosphorylierungs-abhängiger Effekt zu beobachten, der allerdings nicht wie erwartet eine verstärkte Kosedimentation von Gephyrin mit der unmodifizierten GABA_AR-β2-Loop Variante zeigte. Die Alanin-Variante wies nach Behandlung eine erhöhte Bindung an Gephyrin auf. Diese Variante entspricht einem am Serin 410 nicht phosphorylierten Loop und sollte als Kontrolle dienen und in beiden Ansätzen vergleichbare Mengen Gephyrin sedimentieren. Somit war eine gleichbleibend starke Bindung für die S410D- und eine gleichbleibend schwächere Bindung an die S410A-Variante zu erwarten, während der unmodifizierte Loop im Ansatz mit zusätzlichem ATP eine verstärkte Bindung an Gephyrin aufgrund der Phosphorylierung des Loops am Serin 410 aufweisen sollte. Die hier gezeigten Ergebnisse (Abb. 2.6) deuten darauf hin, dass zwar ein Phosphorylierungs-abhängiger Effekt vorliegt, dieser allerdings nicht aufgrund der Phosphorylierung des Serins 410 erfolgt bzw. nicht nur durch diesen Serin-Rest zu erklären ist. Weitere Phosphorylierungsstellen innerhalb des Rezeptor-Loops, die die Bindung ebenfalls beeinflussen, sind denkbar. Eine massenspektrometrische Analyse der eingesetzten Rezeptor-Loops könnte Aufschluss über eine potentielle Phosphorylierung geben und einen weiteren Hinweis diesbezüglich liefern. Ein Einfluss der GST-Fusion ist dagegen auszuschließen, da GST als Negativkontrolle eingesetzt wurde und keinerlei unspezifische Bindung an Gephyrin aufwies. Der GlyR-β-Loop wurde dagegen als Positivkontrolle mitgeführt. Durch dessen Phosphorylierung am Serin 403 verringert sich die Affinität zu Gephyrin (Specht et al., 2011). Ein solcher Effekt konnte hier ebenfalls beobachtet werden. Zwar kann dieser nicht eindeutig der Phosphorylierung des Serins 403 zugewiesen werden, eine signifikant schwächere Sedimentation von Gephyrin durch den GlyR-β-Loop im potentiell phosphorylierten Ansatz deutet jedoch darauf hin.

Auch die Phosphorylierung des Gephyrins könnte einen Einfluss auf die Bindungsaffinität zum Rezeptor ausüben. Da die Kinasen des Hirnextrakts potentiell alle im Ansatz enthaltenen Proteine phosphorylieren, kann die verstärkte Gephyrin-Bindung im Ansatz mit ATP hier nicht eindeutig zugeordnet werden. Es wäre aber auch ein indirekter Einfluss wie

die phosphorylierungs-abhängige Bindung eines Gephyrin-Interaktionspartners, wie beispielsweise Pin1, denkbar. Zwar wurde von Bausen und Kollegen (2010) vermutet, dass die Pin1-Isomerisierung des Gephyrins für die GlyR- β -Loop-Bindung, nicht aber für die Interaktion mit der GABA_AR- α 2- und - γ 2-Untereinheit ausschlaggebend ist, trotzdem sind weitere Studien nötig, um dies für die genannten sowie alle weiteren mit Gephyrin-interagierenden GABA_AR-Untereinheiten beurteilen zu können. Somit lassen die hier gezeigten *in vitro* Phosphorylierungen keine genauen Aussagen über einen möglichen Einfluss der S410-Phosphorylierung auf die Gephyrin-GABA_AR- β 2-Interaktion zu. Der vermutete Effekt (Abb.3.4) kann somit nicht ausgeschlossen, aber auch nicht bestätigt werden. Es wurden Hinweise auf einen Einfluss weiterer Phosphorylierungsstellen auf die Bindung geliefert, denen in zusätzlichen Versuchen, beispielsweise mit phosphomimetischen Varianten potentieller Phosphorylierungsstellen, nachgegangen werden sollte.

```

beta1  FFGKGPQ--KKGASKQDQSANEKNRLEHNKYQYDAHGNILLSTLEIRNETSGSEVLTGVSDPK
beta2  FFGRGPQRQKKAAEKAANANNEKNRLDYNKH--DPHENILLSTLEIKNEMATSEAVMGLGDPR
beta3  FFGRGPQRQKKLAEKTAKAKNDRSKSEINRY--DAHGNILLAPMDVHNEM--NEVAGSVGDTR
beta1  ATHYSYDSASIQYRKPLSSREGFGRGL-DRHGYPGKGRIRRRASSQLKYKIPDLTDYNSIDKWSR
beta2  STHLAYDASSIQYRKAGLPRHSFGRNALERHVAQKKSRLRRRASSQLKITIPDLTDYNAIDRWSR
beta3  NSAISFDNSGIQYRKQSHPKEGHGRYNGDRSIPHKKTHLRRRSSQLKIKIPDLTDYNAIDRWSR

```

Abb.3.5: Alignment der GABA_AR- β 1-3 cytoplasmatischen Loops zwischen den Transmembrandomänen drei und vier. Hervorgehoben sind die bereits identifizierten Phosphorylierungsstellen (blauer Kasten; zusammengefasst in Luscher et al., 2011), das AP2- (roter Kasten; Kittler et al., 2005) und NSF-Bindungsmotiv (Pfeil; Goto et al., 2005) sowie die in dieser Arbeit identifizierte Gephyrinbindestelle in der β 2- und β 3-Untereinheit (grüner Kasten). Schwarz: hoch konserviert; rot: gering konserviert; grau: neutral.

Interessanterweise enthält die Gephyrin-Bindestelle neben dem AP2-Motiv auch eine Überlappung mit einer NSF-Erkennungssequenz (Abb.3.5). Diese hexamere ATPase ist hauptsächlich an Membran-Fusionen (Zhao et al., 2007) und an der Translokation assemblierter GABA_ARs vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran beteiligt, wobei ihre Überexpression zu einer reduzierten Anzahl an GABA_ARs in der Plasmamembran führt (Goto et al., 2005). Somit weist dieser Teil des Rezeptors Bindestellen für drei Proteine auf, die an der Insertion, Clusterung und Internalisierung von β -Untereinheiten enthaltenden Pentameren beteiligt sind. Dadurch bekommt diese Sequenz eine wichtige, regulative Bedeutung für die Anzahl an Oberflächen-exponierten sowie synaptischen und extrasynaptischen GABA_ARs. Eine zu GABA_ARs vergleichbare Art der Regulation ist auch für exzitatorische AMPA-Rezeptoren bekannt. So konnte für die GluR2-Untereinheit eine überlappende Bindestelle für den AP2-Komplex und NSF nachgewiesen werden, die eine Rolle im Transport von AMPA-Rezeptoren spielt (Lee et al., 2002). Somit ist eine Regulation

mehrerer, entgegengesetzt wirkender Mechanismen über dieselbe Bindestelle im cytoplasmatischen Loop ein oft zu findendes Prinzip und erhöht möglicherweise die Effizienz dieser Prozesse.

Das in AMPA-Rezeptoren identifizierte AP2-Bindemotiv ist vergleichbar zur GABA_AR-β2-Untereinheit und anderer Membranproteine atypisch und auch in der Aminosäure-Zusammensetzung ähnlich (Diviani et al., 2003; Haucke et al., 2000). Des Weiteren konnte ein Arginin-Cluster innerhalb dieser Sequenz identifiziert werden, das sowohl für die Bindung von AMPARs (Kastning et al., 2007; Lee et al., 2002), als auch GABA_AR-β-Untereinheiten (Smith et al., 2012) an die μ2-Untereinheit des AP2-Komplexes ausschlaggebend ist. Auch die Bindestelle innerhalb der μ2-Untereinheit ist für beide Rezeptoren überlappend, was auf einen vergleichbaren Internalisierungsmechanismus der postsynaptischen Neurotransmitter-Rezeptoren schließen lässt (Kastning et al., 2007; Smith et al., 2012). Somit scheint es sich um einen konservierten Mechanismus für die AP2-Bindung an neuronale Membranproteine und Neurotransmitter-Rezeptoren zu handeln.

Weiterhin konnte für exzitatorische Rezeptoren eine phosphorylierungs-abhängige Regulation der synaptischen Lokalisation nachgewiesen werden. Gegensätzlich zu den GABA_AR-β-Untereinheiten verstärkt jedoch eine erhöhte PKC-Aktivität in Purkinje-Zellen die AMPA-Rezeptor-Internalisierung. Im Cerebellum inhibiert dagegen die PKC-abhängige AMPAR-Phosphorylierung des Serins 880 innerhalb der GluR2-Untereinheit die Interaktion mit dem PDZ-Domänen-Protein GRIP1 (*glutamate receptor interacting protein 1*) (Matsuda et al., 1999), das AMPARs an der Synapse stabilisiert. Gleichzeitig wird die Bindung an das ebenfalls PDZ-Domänen enthaltende Protein PICK1 (*protein that interacts with C kinase 1*), was die Endocytose vermittelt, verstärkt (Chung et al., 2000). Die Deletion der mit PDZ-Domänen-Proteinen interagierenden Bereiche innerhalb des Rezeptors führte ebenfalls zu einer verstärkten AMPAR-Internalisierung (Matsuda et al., 1999; Xia et al., 2000), was auch hier eine Beteiligung von Rezeptor-clusternden Proteinen an der Regulation des Equilibriums zwischen synaptischer Lokalisation und Internalisierung widerspiegelt. Somit scheint es einen allgemeingültigen Mechanismus für die Internalisierung von unterschiedlichen Rezeptoren zu geben, wobei die zu Grunde liegende Regulation, beispielsweise durch Phosphorylierung, signifikante Unterschiede aufweist. Dies ist besonders interessant, da die entgegengesetzten Antworten auf die Rezeptor-Phosphorylierung einen potentiellen Mechanismus zur Regulation des Gleichgewichtes zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Aktivität liefern könnten.

In der vorliegenden Arbeit sowie durch Smolinsky (2009) konnte auch eine Bindung an die GABA_AR-β3-Untereinheit gezeigt werden. Daher wurde diese ebenfalls genauer betrachtet. Aufgrund der hohen Homologie innerhalb der GABA_AR-β2- und -β3-Untereinheiten insbesondere im Bereich der für die β2-Untereinheit identifizierten Gephyrinbindestelle wurde das dazu homologe Konstrukt der β3-Untereinheit erstellt und für Kosedimentationsanalysen eingesetzt. Diese zeigten, dass beide Loop-Fragmente in der Lage sind, Gephyrin spezifisch zu binden und zu sedimentieren, wobei im Vergleich die Interaktion mit der β2-Untereinheit wesentlich stärker zu sein schien. Dies stimmt auch mit Beobachtungen in Neuronen (Prof. Jochen Meier, MDC, Berlin-Buch) überein, wo unter Verwendung von Chimären des GlyR-α1-Rezeptors und den entsprechenden Bindemotiven aus der GABA_AR-β2- bzw. -β3-Untereinheit eine schwächere Bindung an letztere zu verzeichnen war (Kowalczyk et al., unveröffentlichte Daten). Dies ist vergleichbar zu den GABA_AR-α1-3-Untereinheiten, die ebenfalls über vergleichbare Sequenzmotive für die Gephyrinbindung innerhalb des intrazellulären Loops verfügen (Mukherjee et al., 2011; Saiepour et al., 2010; Tretter et al., 2008; Tretter et al., 2011). Somit scheinen Gephyrin-interagierende GABA_AR-Untereinheiten innerhalb einer Subklasse homologe Bindungssequenzen für dieses Protein aufzuweisen.

Immunhistochemische Studien zeigten, dass die β2- überwiegend mit der α1-Untereinheit koexprimiert, wohingegen die β3- hauptsächlich mit der α2- oder α3-Untereinheit nachgewiesen wurde (Fritschy und Mohler, 1995). Werden die zuvor gesammelten Daten sowie Veröffentlichungen zu den GABA_AR-α-Untereinheiten in Betracht gezogen, so lässt sich die abgeschwächte Bindung der β3-Untereinheit möglicherweise durch die bevorzugte Untereinheitenkombination erklären. Während die α1-Untereinheit eine relativ schwache Bindung an Gephyrin aufweist, zeigt vor allem die α3-Untereinheit eine starke Bindungsaffinität. Für die α2-Untereinheit konnte aufgrund technischer Probleme keine spezifische Affinität zu Gephyrin ermittelt werden (Maric et al., 2011), allerdings zeigte auch diese in Kosedimentationsanalysen eine sehr starke Bindung an Gephyrin. Somit gleicht möglicherweise die relativ starke Bindung der β2-Untereinheit die schwache Affinität der α1-Untereinheit zu Gephyrin aus, während die schwächere Bindung der β3-Untereinheit durch die starke Bindung der α2/3-Untereinheiten ausgeglichen werden kann. Somit wird eine effiziente Rezeptor-Clusterung der verschiedenen Rezeptor-Untereinheiten-Kombinationen möglich. Zusätzliche Untersuchungen, wie beispielsweise kompetitive ITC-Messungen sowie neuronale Studien, sind jedoch unverzichtbar, um weitere Erkenntnisse bezüglich der Gephyrin-Bindung an GABA_ARs in Abhängigkeit von der Untereinheiten-Kombination im Pentamer zu erlangen. Auch die Bestimmung der Affinitäten des gesamten

pentameren Rezeptors würde helfen, die Frage der Kooperativität der Untereinheiten zu beantworten. Möglicherweise liegen auch mehrere verschiedene Stufen der Affinität zwischen Rezeptor und Gephyrin vor, die für eine effektive Regulation der synaptischen Stärke auf der Basis von posttranslationalen Modifikationen oder Interaktionen mit weiteren Proteinen eine Möglichkeit liefern, in mehreren Schritten komplexe Signale zu kodieren.

3.1.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen der GABA_AR-β2-Untereinheit und Gephyrin

Zur weiteren Charakterisierung der Bindung zwischen Gephyrin und der GABA_AR-β2-Untereinheit wurden ITC- sowie SPR-Messungen, dynamische Lichtstreuung und analytische Gelfiltration durchgeführt. Für alle Versuche wurde der Rezeptor-Loop in gesamter Länge oder als verkürzte Variante (Aminosäuren 390-420), als GST-Fusion oder isolierter Loop eingesetzt. Dabei war auffällig, dass die GST-Fusion den Loop stabilisierte und dass der gesamte Loop eine gesteigerte Instabilität aufwies. Eine erhöhte Degradation der verschiedenen Loops war in den Reinigungen, analytischen Gelfiltrationen sowie der dynamischen Lichtstreuung zu verzeichnen. Dies führte zu sehr inhomogenen Proteinlösungen, in denen der genaue Anteil an nicht-degradiertem Protein nicht exakt bestimmt werden konnte, was einen negativen Einfluss auf die Messungen sowie die Konzentrationsbestimmung hatte und in die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse einbezogen werden musste. Des Weiteren konnte jedoch in allen Versuchsansätzen ein negativer Effekt der GST-Fusion auf die Bindung ausgeschlossen werden.

Zur Quantifizierung der Bindungsaffinitäten wurden ITC-Messungen mit verschiedenen Rezeptor-Loops und gereinigtem Gephyrin-rC4 durchgeführt (Abb.2.13). Zunächst konnte für die Positivkontrolle, den GST-GlyR-β-Loop, ausschließlich eine exotherme, monophasische Bindungskurve mit einem K_D -Wert von $0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ gezeigt werden. Dies steht in Konflikt mit bereits veröffentlichten Daten, die eine exotherme, biphasische Bindung an Gephyrin postulieren (Schrader et al., 2004). Es ergibt sich daraus eine hoch affine Bindestelle mit einem K_D -Wert von $0,021 \mu\text{M}$ und eine niedrig affine Bindestelle mit einem K_D -Wert von $2,94 \mu\text{M}$ (Specht et al., 2011). Die hier entstandene Diskrepanz resultiert möglicherweise in der Verwendung des GST-fusionierten GlyR-β-Loops. Da GST Dimere bildet, ist anzunehmen, dass auch die Fusion aus Rezeptor-Loop und GST als Dimer vorliegt. In den analytischen Gelfiltrationen konnte bereits eine Di-, aber auch Trimerisierung der verschiedenen GST-fusionierten Rezeptor-Loops nachgewiesen werden. Dies könnte die Struktur des Loops verändern und das im Vergleich zum Loop große GST (GST-Monomer: 26 kDa; GlyR-β-Loop: 16,8 kDa) könnte die Bindung zu einem weiteren Protein beeinflussen

oder verhindern, indem es die entsprechenden Bindungsstellen maskiert. Der hier ermittelte K_D -Wert liegt im Bereich der niedrig affinen Bindestelle, wobei es durchaus möglich ist, dass es sich um eine Bindung des Gephyrins an die hoch affine Bindestelle handelt, diese aber durch das vorhandene GST abgeschwächt wird.

Die SPR-Messungen zur Analyse der Interaktion zwischen Gephyrin und dem GST-GlyR- β -Loop ergaben dagegen einen K_D -Wert von $2,37 \pm 1,73 \mu\text{M}$, womit eine im Vergleich zu den ITC-Messungen reduzierte Affinität (0,9 zu $2,37 \mu\text{M}$) ermittelt wurde (Abb.2.14). Zwar sollte die Bindungsaffinität der beiden Proteine zueinander gleich bleiben, ein Mitführen der Kontrolle ist jedoch zwingend notwendig, um Diskrepanzen aufgrund der verwendeten Methode ausschließen zu können. Zuvor von Sola und Kollegen (2004) durchgeführte SPR-Untersuchungen mit dem isolierten GlyR- β -Loop ergaben eine Affinität zu Gephyrin von 0,4 – 1,1 μM . Dies zeigt ebenfalls wie die ITC-Messungen, dass es zu einem geringen, negativen Einfluss der GST-Fusion auf die Bindungsaffinität des Loops zu Gephyrin kommt. Jedoch liegen beide Messungen in der gleichen Größenordnung, was die hohe Qualität und Reproduzierbarkeit beider Methoden anzeigt.

Die verschiedenen GABA_AR- β 2-Loop-Varianten wiesen in den ITC-Messungen eine endotherme, monophasische Bindungskurve auf. Da die resultierende freie Energie negativ war, handelte es sich auch hier um eine spontan ablaufende, Entropie getriebene Reaktion, für die keine Wärmezufuhr notwendig war. In der Kontrollmessung, in der der Loop anstatt in Gephyrin in Puffer injiziert wurde, zeigte sich allerdings eine vergleichbare Titrationskurve. Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei allen Messungen um unspezifische Reaktionen handelt. Ein Einfluss des GST-tags als Erklärung kann ausgeschlossen werden, da sowohl GST-fusionierte, als auch nicht-fusionierte Rezeptor-Loops ein vergleichbares Bindungsverhalten zeigten. Außerdem wiesen Messungen mit der GST-Kontrolle und mit dem GST-GlyR- β -Loop deutlich verschiedene Reaktionsverläufe auf.

Als eine mögliche Erklärung der ITC-Signale für die GABA_AR- β 2-Loop-Varianten wäre eine Interaktion des GABA_AR- β 2-Loops mit sich selbst denkbar. Dadurch würden oligomerisierte GST-Rezeptor-Loop-Moleküle vorliegen, die über das GST dimerisieren und so in räumliche Nähe gelangen, was weitere Loop-Loop-Interaktionen begünstigen würde. Durch Injektion des konzentrierten GABA_AR- β 2-Loop-Liganden in die Zelle – zum Analyten – wird der Loop verdünnt, was zu einer Veränderung des Bindungsgleichgewichtes zwischen den verschiedenen Multimeren führt und in einer Wärmeänderung resultiert. Die analytischen Gelfiltration sowie die dynamische Lichtstreuung (DLS) zeigten, dass es gerade bei dem gesamten GABA_AR- β 2-Loop, aber auch bei der verkürzten Variante zur Ausbildung höherer Proteinoligomere bis hin zu Aggregaten kam (Abb.2.11). Dies würde dafür sprechen, dass

der Loop mit sich selbst interagiert und es deshalb zu unspezifischen Reaktionen kommt. Allerdings wiesen die DLS-Messungen mit verdünnten Loop-Proben ebenfalls höhere Aggregate auf. Möglicherweise resultieren die ITC-Signale trotz der weiterhin vorhandenen Aggregate entweder aus der Auflösung der einen Aggregationsform oder der Bildung einer anderen Form, was in einer Wärmeänderung resultiert. Es handelt sich hierbei um eine interessante Beobachtung, deren Erklärung möglicherweise zu einem genaueren Verständnis der strukturellen Zusammensetzung der verschiedenen cytoplasmatischen Loops in einem Rezeptor-Pentamer beitragen könnte.

SPR-Messungen führten im Gegensatz zu den ITC-Daten zu eindeutigen Ergebnissen (Abb.2.14). Die kovalente Kopplung des Gephyrins über freie Amine an einen Sensorchip ermöglichte die Bestimmung der Bindungsaffinitäten für verschiedene Rezeptor-Loops. Es wurden die gereinigten, GST-fusionierten Rezeptor-Loops verwendet, da die nicht-fusionierten Loops – besonders die verkürzte GABA_AR-β2-Loop-Variante – aufgrund des geringen Molekulargewichtes in einem zu geringen Signal-zu-Rauscherhältnis aufgrund schwacher Resonanzsignale resultierten.

Die SPR-Messungen für den kompletten sowie verkürzten GST-GABA_AR-β2-Loop sind nahezu identisch. Der K_D -Wert für den kompletten Loop ist mit $54,5 \pm 14,5 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $45,3 \pm 14,4 \mu\text{M}$ der verkürzten Variante etwas erhöht, was auf eine vergleichsweise schwächere Bindung an Gephyrin hindeutet. Weiterhin wäre für den verkürzten Loop eine stärkere Bindung zu erwarten gewesen, da es sich hierbei um die isolierte Bindungsstelle handelte. Somit sollte, aufgrund der Konformation und der daraus resultierenden Lage der Aminosäuren, die Bindungsstelle frei zugänglich sein und die stärkste Bindung an Gephyrin aufweisen. Des Weiteren war sowohl in den Reinigungen als auch den analytischen Gelfiltrationen und der dynamischen Lichtstreuung zu beobachten, dass der verkürzte Loop vergleichsweise stabiler war und weniger Degradation aufwies. Somit sollte die ermittelte Konzentration der tatsächlichen Konzentration des nicht-degradierten Loops entsprechen haben, wodurch die resultierenden Affinitäten eindeutiger sind. Außerdem können die Degradationsprodukte ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung nehmen, insofern sie noch die Bindungsstelle oder zumindest den für die hydrophoben Interaktionen signifikanten Teil enthalten. Da allerdings auch ein Abbau des GST-GlyR-β-Loops zu verzeichnen war, ist der Vergleich dieser Messungen untereinander möglich. Somit ergab sich für die Bindung der GABA_AR-β2-Loops eine 20-fach geringere Affinität im Vergleich zum GlyR-β-Loop.

Eine weitere Analyse der Bindungsaffinität erfolgte unter Verwendung eines N-terminal biotinylierten Peptids (GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀). Die Messungen mit verschiedenen Konzentrationen bakteriell exprimierten Gephyrins ergaben einen K_D -Wert für die Bindung von

9,7 μM . Verglichen mit bekannten SPR-Daten für die GlyR- β -Loop–Gephyrin Interaktion von 0,4-1,1 μM (Sola et al., 2004) ergibt das Biotin-GABA_AR- β 2-Peptid in etwa eine 10-fach schwächere Interaktion mit Gephyrin (Abb.2.15). Bei diesen Messungen sollte keine unspezifische Beeinflussung der Bindung durch Degradation vorliegen, da das eingesetzte Gephyrin nicht abgebaut war und das synthetisierte Peptid ebenfalls in hoher Reinheit vorlag.

Im Vergleich ist die GABA_AR- β 2-Interaktion mit Gephyrin mit der Interaktion der α 1/3-Untereinheiten vergleichbar. Somit ergibt sich im Kontrast zum GlyR- β -Loop eine 10-fach schwächere Bindung der Untereinheiten α 3 und β 2 an Gephyrin, wobei die α 1-Untereinheit sich um eine weitere Zehnerpotenz von diesen unterscheidet (Maric et al., 2011) und es fraglich ist, welchen Beitrag diese Untereinheit *in vivo* zur Gephyrin-GABA_AR Interaktion leistet.

Das biotinylierte Peptid wurde zusätzlich für analytische Gelfiltrationen eingesetzt, um weitere Aussagen über die Stöchiometrie der Bindung zu ermöglichen (Abb.2.10). Dies resultierte in einer Abnahme des Peptid-Peaks um 50 % nach Koinkubation mit Gephyrin und lieferte eine weitere Bestätigung der direkten Interaktion beider Proteine. Eine Verschiebung und damit Massenzunahme des Gephyrin-Peaks war jedoch nicht zu verzeichnen, da eine Bindung von 10,8 kDa (drei Peptid-Moleküle) an einen trimeren Gephyrin-Komplex von 382 kDa keine signifikante Größenveränderung bewirkte, die mittels dieser Methode messbar gewesen wäre. Im Gegensatz zu den Gelfiltrationen mit dem GlyR- β -Loop, in denen nach Koinkubation mit Gephyrin eine Abnahme des Loop-Peaks sowie eine Zunahme des Gephyrin-Peaks zu verzeichnen war, konnte dies für die weiteren, gereinigten GABA_AR- β 2-Loops nicht beobachtet werden. Somit kam es scheinbar – abgesehen von dem biotinylierten Peptid - zu keiner derart stabilen Komplexbildung des Gephyrins mit den gereinigten Rezeptor-Loops. Dadurch konnte der resultierende Komplex mittels Gelfiltration nicht aufgetrennt und analysiert werden, was – wie schon in den SPR-Messungen beobachtet – auf eine im Vergleich zum GlyR- β -Loop geringere Bindungsstärke zwischen beiden Proteinen hinweist.

Basierend auf den Ergebnissen der Kosedimentations-Analyse wurde bereits zu Beginn im Vergleich zur GlyR- β -Untereinheit eine schwächere Bindung von Gephyrin an den GABA_AR- β 2-Loop erwartet. Die bislang nicht erfolgte Ko-Aufreinigung von Gephyrin und GABA_ARs über Affinitätschromatographie (Meyer et al., 1995), wie es für den Glycin-Rezeptor gezeigt wurde (Pfeiffer et al., 1982), ist ein weiteres Indiz für die geringere Stabilität des GABA_AR-Gephyrin-Komplexes und unterstreicht die bisherigen Schlussfolgerungen hinsichtlich einer Dissoziation beider Proteine. Außerdem ist eine reduzierte Affinität

konsistent mit der schwächeren synaptischen Mobilität von GABA_ARs im Vergleich zu GlyRs, was durch eine 10-fach höhere Diffusionsrate der GABA_ARs reflektiert wird (Ehrensperger et al., 2007; Levi et al., 2008; Meier et al., 2001).

Die moderaten Affinitäten der verschiedenen isolierten GABA_AR-Loops zu Gephyrin sind vergleichbar mit PDZ-Domänen-Liganden-Interaktionen. So wurden für die Affinität des C-terminalen Endes der NMDA- und AMPA-Rezeptoren und dem für deren Clusterung nötigen Protein PSD95 K_D -Werte im Bereich von 1 bis 50 μ M berichtet (Jemth und Gianni, 2007). Dies zeigt, dass scheinbar der GlyR- β -Loop mit seiner hohen Affinität gegenüber Gephyrin eine Sonderstellung einnimmt. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass sich durch die schwächeren Interaktionen möglicherweise eine höhere Variabilität und Dynamik zur Regulation von Vorgängen wie Lernen oder Speicherung von Informationen ergibt. Dagegen benötigt möglicherweise die Weiterleitung von motorischen Signalen durch den Glycin-Rezeptor keine fein regulierten Mechanismen, was die vergleichsweise starre Verankerung an der Synapse rechtfertigt.

3.2 Charakterisierung der direkten Interaktion zwischen der GABA_AR- γ 2-Untereinheit und Gephyrin

Die Kosedimentationsanalysen mit GST-fusionierten GABA_AR- γ 2-Rezeptor-Loops wiesen auf die Fähigkeit der γ 2L-, aber nicht der γ 2S-Isoform Gephyrin zu sedimentieren hin. Das minimale Gephyrin-Bindungsmotiv konnte somit auf den acht Aminosäuren langen Einschub in der längeren Spleiß-Variante eingegrenzt werden kann (Abb.2.16). Die γ 2L-Isoform dominiert während der Entwicklung über die γ 2S-Variante (Burt und Kamatchi, 1991). Außerdem werden während der Synaptogenese bereits GABA_AR- γ 2-Cluster ausgebildet, bevor ein Gephyrin-Netzwerk an der Synapse detektierbar ist. Im Laufe der Entwicklung nimmt jedoch die Kolo-kalisation der γ 2-Cluster mit Gephyrin zu (Danglot et al., 2003), was für eine entwicklungs-abhängige Interaktion spricht und die hier beobachtete Interaktion mit Gephyrin unterstützt.

Die γ 2L-Isoform weist eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle an Position 343 auf. Zusammen mit der Beobachtung, dass bei erhöhter PKC-Aktivität das γ 2L-spezifische Serin 343 für eine erhöhte Akkumulation in synaptischen Bereichen verantwortlich ist (Meier und Grantyn, 2004), erlaubt dies die Annahme, dass die Phosphorylierung des Serins 343 möglicherweise die Bindung an Gephyrin und die dadurch vermittelte Clusterung an inhibitorischen Synapsen reguliert. Letzteres konnte jedoch in Kosedimentationsanalysen mit

phosphomimetischen Varianten nicht bestätigt werden. Die S343D-Variante wies dabei eine mit der nicht-modifizierten $\gamma 2L$ -Isoform vergleichbare Bindung an Gephyrin auf. Dagegen war eine signifikant höhere Bindungsstärke für die S327D-Variante sowohl der $\gamma 2S$ - als auch $\gamma 2L$ -Isoform zu verzeichnen. Die Phosphorylierung dieses Serin-Restes scheint somit einen Effekt auf die Interaktion zu haben, wodurch auch die $\gamma 2S$ -Variante, die zuvor keinerlei Bindung aufwies, befähigt wird, Gephyrin vergleichbar zur unmodifizierten $\gamma 2L$ -Variante zu sedimentieren (Abb.2.17).

Da die Kosedimentationsanalysen mit Hirnröhextrakt durchgeführt wurden, sind keine Aussagen über eine direkte Interaktion mit Gephyrin möglich. Allerdings scheint es sich aufgrund des Signals, das teilweise stärker war als für die Positivkontrolle – den GlyR- β -Loop – um eine verhältnismäßig starke Interaktion zu handeln. Smolinsky (2009) konnte zuvor weder eine direkte Interaktion zwischen der GABA_AR- $\gamma 2$ -Untereinheit mit gereinigtem, bakteriell exprimiertem Gephyrin noch mit Hirnextrakt nachweisen. Möglicherweise ist eine abweichende Versuchsdurchführung ausschlaggebend für die unterschiedlichen Ergebnisse. So wurde hier zur Erstellung des Hirnextraktes 0,05 % Triton-X-100 eingesetzt. Dieses Protokoll unterscheidet sich sowohl zu dem von Smolinsky (2009) als auch zu dem von Tretter und Kollegen (2008). Letztere konnten sogar nachweisen, dass die Interaktion der GABA_AR- $\alpha 2$ -Untereinheit durch Zugabe von Detergens inhibiert wird, was für die in dieser Arbeit mittels Kosedimentation analysierten Gephyrin-Rezeptor-Loop-Interaktionen nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise wird durch das zugefügte Detergens der Pool an synaptischem – posttranslational modifiziertem – Gephyrin im löslichen Überstand des Hirnextraktes erhöht. Dadurch ergibt sich ein positiver Einfluss auf den Nachweis einer physiologisch relevanten Bindung, was darauf hindeutet, dass nicht nur die Phosphorylierung der $\gamma 2$ -spezifischen Serine, sondern auch die Modifikation des Gephyrins durch Phosphorylierung oder eine andere posttranslationale Modifikation eine entscheidende Rolle für die Rezeptor-Gephyrin-Interaktion spielt. Dies zeigt erneut, dass es sich bei der Clusterung inhibitorischer GABA_ARs um einen hoch komplexen und stark regulierten Prozess handelt, der mehreren regulatorischen Mechanismen zugleich unterliegen kann. Bakteriell exprimiertes Gephyrin liegt dagegen ohne Eukaryoten-spezifische posttranslationale Modifikationen vor, was die isolierte Betrachtung von Modifikationen der Rezeptor-Loops erlaubt.

Aufgrund der hier gezeigten Daten scheint die Phosphorylierung des $\gamma 2$ -Rezeptor-Loops einen Einfluss auf die Gephyrin-Bindung – direkt oder indirekt – zu haben, wobei insbesondere dem Serin 327 eine regulative Funktion in Bezug auf die synaptische Lokalisation von $\gamma 2$ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren zugesprochen werden kann. Letzteres

ist konsistent mit bereits veröffentlichten Daten, die zeigen, dass im Zusammenspiel mit der Aktivität von NMDA-Rezeptoren GABA_A-Rezeptoren mit phosphoryliertem Serin 327 in der $\gamma 2$ -Untereinheit synaptisch akkumulieren, wohingegen Rezeptoren mit der nicht phosphorylierten Untereinheit extrasynaptisch lokalisiert sind (Muir et al., 2010). Dabei bewirkt die Öffnung der NMDA-Rezeptoren einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Dies aktiviert die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin, die eine Dephosphorylierung der GABA_AR- $\gamma 2$ -Untereinheit an der Position des Serins 327 induziert (Wang et al., 2003). Als Folge dessen ist eine erhöhte Akkumulation extrasynaptischer Rezeptoren zu verzeichnen (Abb.3.6). Da gezeigt wurde, dass dieser Prozess Clathrin-unabhängig ist, kommt es nicht zur Internalisierung der Rezeptoren, sondern ausschließlich zu einer verstärkten lateralen Diffusion (Muir et al., 2010). Eine mögliche Beteiligung von Gephyrin an dieser Regulation wäre somit nicht ausgeschlossen.

Die hier gezeigten Daten sprechen dafür, dass Gephyrin eine erhöhte Affinität zu Rezeptoren aufweist, die innerhalb der $\gamma 2$ -Untereinheit am Serin 327 phosphoryliert sind, was in einer verstärkten Clusterung dieser Rezeptor-Pentamere im Bereich der GABAergen Synapse und einer erhöhten synaptischen Stärke resultiert. Kommt es zu einer zunehmenden Aktivität der exzitatorischen NMDA-Rezeptoren, wird die inhibitorische Synapsen-Aktivität reduziert. Calcineurin bewirkt eine Dephosphorylierung des Serins 327 und die Bindungsaffinität von Gephyrin zur $\gamma 2$ -Untereinheit sinkt. Gephyrin ist zwar weiterhin in der Lage, zumindest die $\gamma 2L$ -Untereinheit zu binden, doch mit einer weitaus geringeren Affinität. Es kommt zur lateralen Diffusion einiger Rezeptor-Pentamere aus der postsynaptischen Membran in extrasynaptische Bereiche, während einige ebenfalls nicht-phosphorylierte Rezeptoren weiterhin an Gephyrin gebunden vorliegen und in synaptischen Bereichen geclustert werden (Abb.3.6). Die laterale Diffusion ermöglicht dabei einen Austausch synaptischer und extrasynaptischer Rezeptoren innerhalb von Sekunden (Tardin et al., 2003), wobei gleichzeitig ein extrasynaptischer Pool von Rezeptoren als Reserve bestehen bleibt. Endo- und exozytische Prozesse benötigen dagegen jeweils mehr als 10 min und resultieren in einer vergleichsweise langsameren und weniger effizienten Modulation der synaptischen Stärke (Shepherd und Huganir, 2007). Um diese Hypothese (Abb. 3.6) zu verifizieren, sind weitere Experimente wie beispielsweise *in vitro* Phosphorylierung sowie Kollokalisationsstudien in neuronalem Kontext gepaart mit ITC- bzw. SPR-Messungen notwendig, die eine Quantifizierung der Bindungsaffinität der unterschiedlichen Zustände erlaubt, ähnlich den jüngsten Studien zur Regulation der Gephyrin-GlyR-Interaktion (Specht et al., 2011).

Bannai und Kollegen (2009) konnten nachweisen, dass eine gesteigerte exzitatorische Aktivität zur Abnahme sowohl synaptischer GABA_AR als auch Gephyrin-Cluster führt, was möglicherweise auf einen zusätzlichen Effekt des Calcineurins auf Gephyrin zurück zu führen ist. Dies widerspricht jedoch neuesten Studien, die zeigen, dass die Calcineurin-abhängige GABA_AR-Mobilität kein Gephyrin benötigt. Es ist erst eine erhöhte Mobilität und dann die Auflösung der Gephyrin-Cluster zu verzeichnen, was für voneinander entkoppelte Prozesse spricht. Somit wird die Mobilität nicht durch die Auflösung des Gephyrin-Netzwerkes bedingt (Niwa et al., 2012). An der Synapse ist Gephyrin hauptsächlich an Rezeptoren gebunden. Allerdings sind insbesondere in den Endbereichen der Synapse Gephyrin-Moleküle zu detektieren, die ohne gebundenen Rezeptor vorliegen, jedoch bereit sein sollten, Rezeptoren zu binden, wenn diese aus dem extrasynaptischen in den synaptischen Bereich diffundieren. Dabei handelt es sich um ein Equilibrium, in dem das Gephyrin-Gerüst sowohl als Akzeptor als auch Donor für die Rezeptoren fungiert (Dumoulin et al., 2000) und somit einen ständigen Austausch zwischen synaptischen und extrasynaptischen Bereichen reguliert. Die von Bannai und Kollegen (2009) beobachteten Abläufe könnten dagegen für eine langfristige Regulation der Größe des Gephyrin-Netzwerkes sprechen. Für kurzfristige Änderungen scheint es jedoch nicht notwendig zu sein, das Gephyrin-Netzwerk aufzulösen.

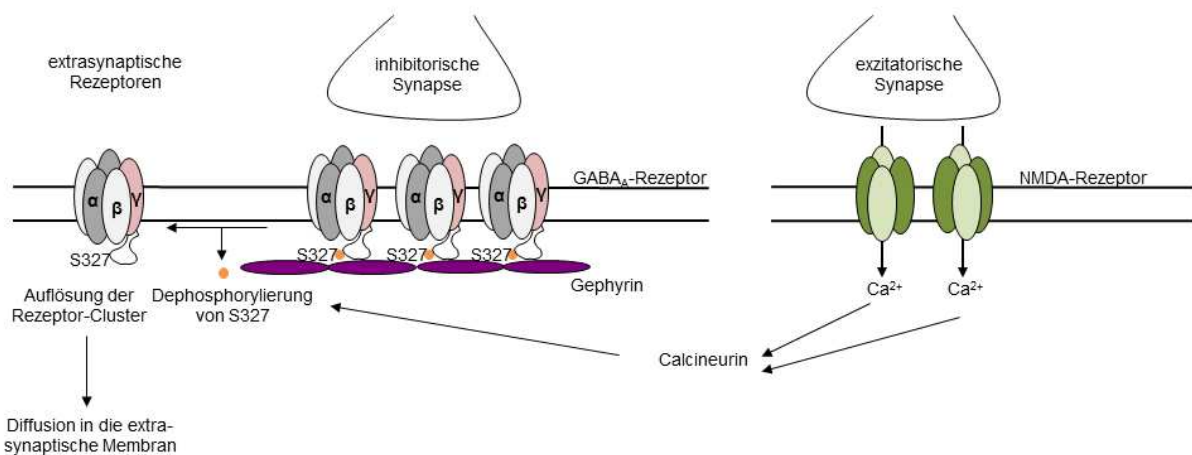


Abb.3.6: Hypothese zur Regulation der Clusterung und lateralen Mobilität von GABA_ARs durch NMDA-Rezeptoraktivierung. Eine erhöhte exzitatorische Aktivität von NMDA-Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Dies aktiviert die Phosphatase Calcineurin, die die GABA_AR-γ2-Untereinheit spezifisch am Serin 327 dephosphoryliert. Dadurch sinkt die Affinität zu Gephyrin und es kommt zur lateralen Diffusion der Rezeptoren in extrasynaptische Bereiche.

Die geschilderten Prozesse stellen einen Mechanismus zur wechselseitigen Regulation zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Aktivität dar. Dieser kann jedoch verschiedener Art sein und unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen unterliegen. Während hier die

Aktivität exzitatorischer NMDARs zur Reduktion inhibitorischer Aktivität führt, ist im Rückenmark ein NMDAR-induzierter Anstieg synaptischer GlyRs zu verzeichnen. GABA_ARs (an gemischten Synapsen) sowie Gephyrin bleiben davon unbeeinflusst (Levi et al., 2008). Des Weiteren konnte für AMPARs ebenfalls eine NMDAR-abhängige Regulation im Hippocampus gezeigt werden, wobei diese in der Endocytose des AMPA-Rezeptors resultiert. Durch die Öffnung des NMDA-Rezeptors wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht und Calcineurin aktiviert. Es kommt jedoch nicht zur Dephosphorylierung des Rezeptors oder anderer stabilisierender Proteine, sondern endocytotischer Faktoren (Man et al., 2000). Somit scheinen zwar ähnliche Mechanismen in die Regulation der Plastizität der verschiedenen Synapsen involviert zu sein, diese unterliegen jedoch verschiedenen Signaltransduktionswegen und -prozessen.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann sowohl für die GABA_AR-β2-, als auch -γ2-Untereinheit eine verstärkte Gephyrin-Bindung nach Phosphorylierung des Rezeptor-Loops vermutet werden. Im Gegensatz dazu wurde für die GlyR-β- (Specht et al., 2011) und die GABA_AR-α1-Untereinheit (Maric et al., 2011) eine verminderte Affinität durch die Phosphorylierung eines spezifischen Serin- bzw. Threonin-Restes nachgewiesen. Nach der Modifikation dieser Reste werden jedoch keine weiteren Signalwege an- bzw. ausgeschaltet, worin möglicherweise der Unterschied liegt.

Interessanterweise trägt die γ2-Untereinheit zwei AP2-Bindemotive. Ein γ2-spezifisches YGYECL-Motiv sowie eine basische Sequenz (Aminosäuren 318-327), die vergleichbar mit denen der GABA_AR-β-Untereinheiten sowie AMPARs ist (Kittler et al., 2008; Smith et al., 2008). Letzteres γ2-Motiv umfasst auch das Serin 327. Zwar wurde bisher kein Phosphorylierungs-abhängiger Mechanismus – vergleichbar zur β3-Untereinheit – für die γ2-Untereinheit gezeigt, ein solcher wäre aber durchaus denkbar. Letzteres würde die Frage aufwerfen, ob eine wechselseitige Regulation der Gephyrin-AP2-Bindung vorliegt, so wie sie in dieser Arbeit für das Serin 410 der β2-Untereinheit vorgeschlagen wurde. Wäre dies der Fall, würden vermutlich verschiedene Kinasen bzw. vorgeschaltete regulatorische Mechanismen greifen, da die durch Calcineurin induzierte laterale Diffusion der Rezeptoren keine erhöhte Endocytose-Rate der Rezeptoren bewirkt. Auffällig sind die hohen Affinitäten der μ2-Untereinheit des AP2-Komplexes zu den Rezeptor-Loops. Diese beträgt für die γ2-Untereinheit 42 nM (Kittler et al., 2008) und für die β3-Untereinheit 300 nM (Kittler et al., 2005) und unterscheidet sich somit um ein vielfaches von der Affinität der GABA_AR-Loops zu Gephyrin. Ob jedoch eine wechselseitige Regulation der beiden Mechanismen – Clusterung und Internalisierung – besteht, muss sowohl für die GABA_AR-β2- als auch die -γ2-Untereinheit durch weitere biophysikalische sowie zelluläre Studien in Neuronen analysiert

werden. Erkenntnisse darüber könnten weitere Einblicke in die komplexen Regulationsmechanismen an der inhibitorischen Synapse geben.

3.3 Loop-Loop-Interaktionen innerhalb eines funktionellen Rezeptor-Pentamers

Neben der Analyse der Gephyrin-interagierenden GABA_AR-Untereinheiten ist es weiterhin fraglich, ob die Struktur der intrazellulären Loops einen entscheidenden Einfluss auf diese Interaktion ausübt. Agieren die Loops der verschiedenen Untereinheiten für sich allein oder bilden sie eine gemeinsame Struktur über eine Loop-Loop-Interaktion aus, die die Bindung an cytoplasmatische Proteine definiert? Um dieser Frage nachzugehen, wurden Kolokalisationsstudien in HEK293-Zellen mit fluoreszenz-markierten GABA_AR-Loops durchgeführt. Die einzelnen Loops waren ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Da die Loops ein intrinsisches Kernlokalisierungssignal in Form der positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin aufweisen, kann die untypische subzelluläre Lokalisation erklärt werden. Kleine Proteine wie beispielsweise GFP können aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes die Kernporen passieren und sind daher sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern nachweisbar. Aufgrund ihres Molekulargewichtes wäre auch eine Anreicherung der Loops sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern zu erwarten gewesen. Da ihre Expression jedoch ausschließlich im Nukleus detektiert werden konnte, scheint die Lokalisation vollständig durch das Kernlokalisierungssignal getrieben zu werden.

Auch eine Koexpression mit Gephyrin änderte die Lokalisation nicht – weder für die einzelnen, noch die ko- bzw. dreifach-transfizierten Loops. Eine Rekrutierung der Loops in die Gephyrin-*blobs* wurde erwartet, insofern es zu einer Interaktion mindestens eines Loops mit Gephyrin kommt. Allerdings war es nicht nachweisbar, ob es überhaupt zu einer Ausbildung einer spezifischen – mit der im Rezeptor-Pentamer vergleichbaren – Struktur nach Koexpression der verschiedenen Loops gekommen ist. Zwar wurden hier ausschließlich auch neuronal auftretende Untereinheiten-Kombinationen eingesetzt, jedoch ist es fraglich, ob die isolierten Loops eine vergleichbare Konformation wie im Rezeptor annehmen können.

Des Weiteren wurde ausschließlich die Fluoreszenz der Loops dargestellt. Möglicherweise wäre eine zusätzliche Darstellung der Gephyrin-Lokalisation interessant gewesen. Kommt es tatsächlich zur Interaktion mit den Rezeptor-Loops wäre eine Rekrutierung des gebundenen Gephyrins zusammen mit den Loops über deren

Kernlokalisierungssignal in den Kern denkbar. Allerdings würde dies ausschließlich Aufschluss über eine mögliche Loop-Gephyrin-Interaktion, aber nicht über eine Loop-Loop-Interaktion geben.

Bereits in früheren Studien wurde eine Wechselwirkung der Loops eines pentameren Rezeptors untereinander vermutet (Brandon und Moss, 2000). Die Interaktion des GABA_AR- γ 2-Loops mit den γ 1-3- und β 1-3-Loops konnte bereits nachgewiesen werden (Nymann-Andersen et al., 2002). Das 23 Aminosäuren (389-411) umfassende Selbst-Assemblierungsmotiv innerhalb des γ 2-Loops (Nymann-Andersen et al., 2002) überlappt dabei mit der GABARAP- (Wang et al., 1999), nicht aber mit der in dieser Arbeit postulierten Gephyrin-Bindestelle. Dies verstärkt die Vermutung, dass es im cytoplasmatischen Teil eines GABA_AR-Pentamers zur Interaktion der Loops miteinander und somit zu einer möglicherweise geordneten Struktur, die die Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen moduliert, kommen könnte.

3.4 Potentielle Modulation von GABA_ARs an inhibitorischen Synapsen in Abhängigkeit von Gephyrin

Die hier gezeigten Ergebnisse sowie die bereits bekannten Studien zur Gephyrin-GABA_AR-Interaktion zeigen, dass es sich bei der Clusterung von GABA_A-Rezeptoren um einen weitaus komplexeren Mechanismus handelt, als für den Glycin-Rezeptor beschrieben wurde. Ein Grund für diese Komplexität liegt in der weitaus höheren Vielfalt an möglichen Rezeptor-Zusammensetzungen begründet.

Für den GABA_AR wurde zuvor nur eine direkte Interaktion mit den Untereinheiten α 1-3 nachgewiesen. Diese sind ausschließlich mit zwei Untereinheiten in einem Pentamer vertreten und weisen untereinander unterschiedliche Affinitäten in ihrer Bindung gegenüber Gephyrin auf, die zudem weitaus schwächer sind als zwischen Gephyrin und dem GlyR- β -Loop. Dies ist auch für die in dieser Arbeit gezeigte Bindung zwischen Gephyrin und den GABA_AR- β 2/3-Untereinheiten zutreffend. Somit scheint die Bindungsstärke nicht vergleichbar zu sein und eine Bindung weiterer Untereinheiten durch Gephyrin zur effizienten Clusterung der GABA_A-Rezeptoren an der Synapse kann vermutet werden. Gleichzeitig bleibt es unklar zu welchem Anteil kooperative Prozesse zwischen den Untereinheiten die effektive Affinität zwischen Gephyrin und dem Rezeptor modulieren.

Erkenntnisse aus immunhistochemischen Färbungen sowie Gephyrin und GABA_AR *knock-out*-Mäusen zeigten eine Kolo-kalisation von Gephyrin mit α 1-3-, β 2/3- oder γ 2-

Untereinheiten enthaltenden GABA_ARs (Sassoe-Pognetto et al., 1995; Sassoe-Pognetto et al., 2000). Weiterhin konnte in Gephyrin *knock-out*-Mäusen ein Verlust von postsynaptischen $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$, nicht aber $\alpha 1$ und $\alpha 5$ GABA_AR-Clustern nachgewiesen werden (Kneussel et al., 1999). Dies unterstreicht die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Zum einen wurde eine direkte Interaktion zwischen Gephyrin und der $\beta 2/3$ - sowie ein Gephyrin-abhängiger Effekt auf die $\gamma 2$ -Untereinheit gezeigt, was durch die Studien in *knock-out* Mäusen zu vermuten war. Zusätzlich konnte sowohl in dieser Arbeit, als auch schon durch Smolinsky (2009) und neuronale Studien mit GlyR- $\alpha 1$ -GABA_AR-Chimären (durchgeführt von Prof. Jochen Meier, MDC Berlin-Buch; Kowalczyk et al., unveröffentlichte Daten) eine schwache Gephyrin-Bindung an die GABA_AR- $\alpha 1$ -Untereinheit nachgewiesen werden, wobei vor allem die neuronalen Studien auch auf eine Gephyrin-unabhängige Clusterung der $\alpha 1$ -Untereinheit hinwiesen. Maric und Kollegen (2011) zeigten zwar, dass es zu einer direkten Bindung zwischen Gephyrin und dieser Untereinheit kommt, doch die ermittelte Bindungsaffinität weist ebenfalls auf eine wesentlich schwächere Bindung im Vergleich zu den übrigen Untereinheiten hin. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass die GABA_AR-Clusterung nicht bzw. nicht hauptsächlich auf der $\alpha 1$ -Untereinheit basiert. Außerdem können $\alpha 1\beta 2$ -Pentamere unabhängig von Gephyrin an der Synapse akkumulieren (Kneussel et al., 2001), während $\alpha 2\beta 2$ - und $\alpha 3\beta 2$ -Rezeptoren auf eine Stabilisierung durch Gephyrin an der Synapse angewiesen sind (Essrich et al., 1998; Kneussel et al., 1999). Auch die Beobachtung, dass $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren in Gephyrin *knock-out*-Mäusen an der Postsynapse lokalisiert sind (Kneussel et al., 2001), lässt vermuten, dass die $\alpha 1$ -Untereinheit eine untergeordnete bzw. keine Rolle in Bezug auf die Gephyrin-abhängige Clusterung spielt. Auch das Fehlen eines Isoleucins oder Valins zur homologen Position 400 des GlyR- β -Loops, wie es für die GABA_AR- $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -, $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Untereinheiten gezeigt wurde (vgl. 3.1.1), weist auf einen abweichenden Bindungsmechanismus hin. Beispielsweise wurde für die GABA_AR- $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Untereinheit eine Interaktion mit dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex nachgewiesen, der ebenfalls zur Stabilität der Rezeptoren in synaptischen Bereichen beitragen kann (Haenggi und Fritschy, 2006; Knuesel et al., 1999) und somit eventuell eine schwache Bindung an Gephyrin kompensiert und zur Stabilisierung der $\alpha 1$ -Untereinheit an der Synapse führt. Der DGC-Komplex hat zwar keinen Einfluss auf das Gephyrin-Netzwerk, es ist allerdings fraglich, ob es sich um einen unabhängigen oder ergänzenden Mechanismus der Clusterung handelt.

Da der mit 60 % am häufigsten nachgewiesene Subtyp des GABA_ARs aus zwei $\alpha 1$ -, zwei $\beta 2$ - und einer $\gamma 2$ -Untereinheit besteht, muss die effiziente Gephyrin-abhängige Clusterung somit unabhängig von $\alpha 1$ auch über weitere Untereinheiten erfolgen. Dies stärkt wiederum

die hier gezeigten Ergebnisse, dass dies über die $\beta 2$ - und möglicherweise auch über die $\gamma 2$ -Untereinheit geschieht.

Die Analysen der Bindungsaffinität von GABA_AR- $\beta 2/3$ - und - $\alpha 1/3$ -Untereinheiten zu Gephyrin (diese Arbeit, Maric et al., 2011) haben eine vergleichbare Affinität gezeigt, wie es auch schon an exzitatorischen Synapsen beobachtet wurde (Jemth und Gianni, 2007). Gephyrin verfügt über eine deutlich höhere Affinität zum GlyR- β -Loop bedingt durch zwei Bindestellen, was im Gegensatz zum GABA_AR auch den intrazellulären Transport des Rezeptors über Gephyrin ermöglicht (Maas et al., 2006). An der Synapse findet dagegen ein regulierter Austausch zwischen dem synaptischen und extrasynaptischen Rezeptor-Pool statt, für den möglicherweise nicht zwingend eine zum GlyR vergleichbar starke Interaktion notwendig ist und die geringeren Affinitäten der GABA_ARs erklären könnte. Die Tatsache, dass der GlyR auch über Gephyrin transportiert wird, spricht für eine Bindung nicht aggregierten Gephyrins an den Rezeptor-Loop (Hanus et al., 2004). Für den GABA_A-Rezeptor wird ein Gephyrin-unabhängiger Transport vermutet, da im Gegensatz zum GlyR in Gephyrin *knock-out*-Mäusen zwar eine verminderte Anzahl von GABA_A-Rezeptor-Clustern in postsynaptischen Bereichen vorliegt, allerdings weiterhin eine Anreicherung der Rezeptoren in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte. Dies ist für GlyRs nicht der Fall, was für unterschiedliche – Gephyrin-abhängige bzw. -unabhängige – Transportmechanismen spricht. Welchen Status der Oligomerisierung Gephyrin während der Bindung an den GABA_AR aufweist, ist nicht bekannt, wobei vermutlich eine Bindung an ein Netzwerk aus Gephyrin-Oligomeren unterhalb der Plasmamembran in postsynaptischen Bereichen stattfindet.

Für den Glycin-Rezeptor wurde die Hypothese formuliert, dass ein Rezeptor über dessen drei β -Untereinheiten pro Gephyrin-Trimer gebunden wird, was durch die α/β -Asymmetrie möglich ist und zur Stabilisierung des Rezeptors innerhalb der postsynaptischen Membran führt (Fritschy et al., 2008). Prinzipiell sind zwei mögliche Clusterungen denkbar, eine 1:1 Wechselwirkung von Gephyrin-Trimeren mit einem heteropentameren Rezeptor und nachgeschalteter Interaktion zwischen Gephyrin-Trimeren/ Hexameren. Bezogen auf die verschiedenen GlyR-Zusammensetzungen ergeben sich nur zwei Möglichkeiten – Gephyrin-abhängige Clusterung der Heteropentamere und Gephyrin-unabhängige Clusterung der Homopentamere.

Der GABA_AR weist allerdings im Kontrast zum Glycin-Rezeptor höchstens zwei Untereinheiten derselben Unterklasse auf. Daher ist es durchaus denkbar, dass weitere Untereinheiten eines Pentamers mit einem Gephyrin-Trimer interagieren, um eine effizientere und stärkere Clusterung zu gewährleisten. Beispielsweise könnten zwei Loops

der einen Untereinheit und ein Loop einer weiteren Untereinheit oder drei Loops von verschiedenen Untereinheiten mit einem Gephyrin-Trimer interagieren. Diese Hypothese sowie der Nachweis, dass sich beide Rezeptoren eine gemeinsame Bindungstasche teilen, lassen vermuten, dass an gemischten GABAergen/glycinergen Synapsen weder in einem Gephyrin-Monomer, noch im Trimer gleichzeitig eine Bindung von GlyRs und GABA_ARs stattfindet. Dieser kompetitive Bindungsmechanismus wurde durch ITC-Messungen bestätigt (Maric et al., 2011). Somit ist zu vermuten, dass je ein Gephyrin-Trimer ein Rezeptor-Pentamer – GlyR oder GABA_AR – bindet und an der Synapse verankert. Kommt es allerdings zu einer Überbrückung von zwei Gephyrin-Trimeren durch ein Pentamer, wären nicht alle Bindungstaschen innerhalb eines einzelnen Trimers von einem Rezeptor belegt. Dadurch wäre auch eine Bindung beider Rezeptor-Typen innerhalb eines Trimeres möglich. Aufgrund der gemeinsamen Bindungstasche ist jedoch die simultane Bindung durch GlyR oder GABA_ARs an ein Gephyrin-Molekül ausgeschlossen.

Trotz der in dieser Arbeit und in früheren Studien nachgewiesenen direkten Interaktion von Gephyrin mit verschiedenen GABA_AR-Untereinheiten lässt dies keine endgültigen Rückschlüsse auf den Mechanismus der GABA_AR-Clusterung an inhibitorischen Synapsen zu. Es bleibt weiterhin die Frage, ob die Stöchiometrie verschiedener Untereinheiten oder nur das Vorhandensein einer Gephyrin-bindenden Untereinheit innerhalb des Pentamers für dessen Clusterung ausschlaggebend ist. Insbesondere Studien in Neuronen, in denen verschiedene Zusammensetzungen eines assemblierten Rezeptors diesbezüglich untersucht werden, sind für ein tieferes Verständnis notwendig.

Weiterhin bleibt offen, ob für die effiziente Clusterung der β 2- und β 3-Untereinheit ausschließlich Gephyrin benötigt wird. Studien zu Collybistin und Neuroligin zeigen eine Beteiligung dieser Proteine an der Synapsen-Bildung und -Stabilität (Papadopoulos et al., 2007; Saiepour et al., 2010). Für die GABA_AR- α 2-Untereinheit konnte sogar eine effizientere Clusterung durch die Bildung eines trimeren α 2-Gephyrin-Collybistin-Komplexes nachgewiesen werden (Saiepour et al., 2010). Dies könnte auch für weitere GABA_AR-Untereinheiten zutreffen.

Die hier gezeigten Ergebnisse weisen auf eine sehr hohe Diversität und Komplexität der Clusterung von GABA_A-Rezeptoren an der Postsynapse hin. Diese unterscheidet sich grundlegend von der Stabilisierung des Glycin-Rezeptors an der Synapse, ist aber vergleichbar mit der Organisation an exzitatorischen Synapsen. Die Aktivität des Glycin-Rezeptors ist hauptsächlich auf das Rückenmark und den Hirnstamm beschränkt, wohingegen komplexe Denkvorgänge wie Lernen und Erinnerung von GABA_A-Rezeptoren abhängig sind. Somit ist es denkbar, dass eine hohe Variabilität mit Spielraum für

verschiedene Affinitäten zu stabilisierenden Proteinen von enormer Bedeutung ist, um diese komplexen Vorgänge regulieren zu können. Dies könnte die im Vergleich zum Glycin-Rezeptor verminderte Affinität der verschiedenen GABA_AR-Untereinheiten zu Gephyrin sowie die – in Bezug auf zusätzliche stabilisierende Faktoren – wesentlich komplexere Struktur GABAerger Synapsen erklären. Es ergibt sich dadurch ein weniger starres Gebilde mit verschiedenen Angriffspunkten zur flexiblen Modulation der synaptischen Plastizität innerhalb des zentralen Nervensystems.

3.5 Ausblick

Die Clusterung von inhibitorischen GABA_A-Rezeptoren ist aufgrund der hohen Diversität dieses Rezeptortyps ein sehr komplexer Prozess. In dieser Arbeit konnten die β -Untereinheiten als weitere Gephyrin-Liganden identifiziert werden. Darüber hinaus wurden bereits existierende Hinweise auf eine mögliche Wechselwirkung mit der γ 2-Untereinheit experimentell gestärkt. Ungeachtet dieser neuen Erkenntnisse sind weiterführende Experimente für ein besseres Verständnis der regulatorischen Zusammenhänge der verschiedenen Arten von Rezeptor-Gephyrin-Interaktion notwendig. Ein nächster Schritt wäre die Fortsetzung der Analyse eines phosphorylierungs-abhängigen Bindungsmechanismus zwischen Gephyrin und der GABA_AR- β 2-Untereinheit. Dazu sollten die SPR-Messungen mit dem biotinylierten Phospho-Peptid wiederholt werden, um Auskunft über die Affinität des phosphorylierten Loops zu Gephyrin zu gewinnen. Auch eine Analyse einer kompetitiven Bindung zwischen Gephyrin und der μ 2-Untereinheit des AP2-Komplexes an die GABA_AR- β 2-Untereinheit wäre aufschlussreich. Eine Untersuchung der Gephyrin-GABA_AR- β 3-Interaktion in Hinblick auf diese Fragestellung wäre ebenfalls sinnvoll.

Zur genauen Analyse der Gephyrin-GABA_AR- β 2-Bindung und der für diese Interaktion essentiellen Aminosäuren auf Seiten des Rezeptors könnten Kosedimentationen mit punktmutierten Rezeptor-Loops durchgeführt werden. Besonders das unpolare Valin an Position 399 könnte aufgrund seiner homologen Position zum Isoleucin 400 des GlyR- β -Loops von hoher Bedeutung sein. Langfristig würde eine Kokristallisation von Gephyrin bzw. dessen E-Domäne mit Gephyrin-interagierenden Rezeptor-Loops weitere Informationen über den Bindungsmechanismus und einen direkten Vergleich mit dem GlyR- β -Loop ermöglichen.

Eine Interaktion der GABA_AR- β 2-Untereinheit mit den Gephyrin-Varianten Geph, Geph-C3 und Geph-C4c konnte mittels Kosedimentation nachgewiesen werden. Eine ausführlichere Analyse mittels ITC- oder SPR-Messungen könnte – wie schon für den

GlyR- β -Loop geschehen (Herweg et al., 2012) – weitere Hinweise auf die potentielle Regulation der Bindung durch die Gephyrin C-Domäne geben. Zusätzlich sollte auch der Einfluss der durch die Pin1-Bindung induzierten Konformationsänderung auf die Interaktion mit den verschiedenen GABA_AR-Untereinheiten analysiert werden.

Ebenso wie für die GABA_AR- β 2-Untereinheit sollte auch die direkte Interaktion des Gephyrins mit der γ 2-Untereinheit genauer betrachtet werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen auf eine von posttranslationalen Modifikationen – sowohl des Loops als auch des Gephyrins – beeinflusste Interaktion hin. Auch diese könnte in SPR-Messungen weiter charakterisiert werden. Eine Analyse der AP2-Bindung an diese Untereinheit und ein möglicher Einfluss des Serins 327 sowie Gephyrins würden ebenfalls weitere Einblicke in die Kontrolle der synaptischen Plastizität – vermittelt durch gegensätzliche Prozesse – ermöglichen.

Für alle bisher beschriebenen Interaktionen zwischen GABA_AR-Untereinheiten und Gephyrin sollten jedoch ausführliche Studien in kultivierten Neuronen durchgeführt werden. Dabei sollte das Augenmerk auf der Untereinheiten-Zusammensetzung im funktionellen Pentamer und der daraus resultierenden Bindung von Gephyrin im neuronalen Kontext gelegt werden. Auch eine Beteiligung weiterer stabilisierender Proteine an der inhibitorischen Synapse – wie beispielsweise Neuroligin und Collybistin – sollte mit einbezogen werden. Nur so können tiefere Aussagen über die zu Grunde liegenden Mechanismen der Gephyrin-abhängigen Clusterung von GABA_ARs gewonnen werden. Detaillierte Informationen über diesen Mechanismus sowie die Regulation der synaptischen Plastizität könnten zum Verständnis von Störungen, die mit dem GABAergen System zusammenhängen, wie z.B. Epilepsie, Neurosen und Schizophrenie beitragen und Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Medikamente liefern.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Enzyme und Chemikalien

Für die Modifikation und für biochemische Analysen eingesetzte Enzyme wurden von den Firmen Sigma, Roche, New England Biolabs, Ferments und AppliChem bezogen. Die verwendeten Feinchemikalien stammen von den Firmen Merck, Fluka, Fermentas, Riedel de Haen, Sigma, Serva, MP Biomedicals, Roth und Promega. Medien und deren Zusätze, die in der tierischen Zellkultur verwendet wurden, wurden von der Firma PAA Laboratories bezogen.

4.1.2 Organismen und Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und Stämme sind in Tabelle 4.1 angegeben.

Tabelle.4.1: Übersicht der verwendeten Organismen und Stämme.

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i>			
DH5 α	Hanahan et al., 1983	F ⁻ , supE44, Δ lacU169, (Δ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA, endA1, gyrA96, thi-1, relA 1	Klonierung und Plasmid-amplifikation
XL10 Gold	Stratagene	endA1, glnV44, recA1, thi-1, gyrA96, relA1, lac, Hte, Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMRmrr) 173, tetR, F'[proAB lacIqZ_M15 Tn10(TetR Amy CmR)]	Klonierung und Plasmid-amplifikation
BL21 DE3 Rosetta star		F ⁻ , ompT, gal, [dcm], (Tanaka et al.), hsdSB(rB-,mB-),_(DE3), rne131, pRARE(CmR)	Expression der pQE-Vektoren
ER2566	New England Biolabs	F- λ - fhuA2 lon ompT lacZ:T7 gene 1 gal sulA11 Δ (mcrC-mrr) 114:IS10 R(mcr-73:miniTn10-TetS)2 R(zgb-210:Tn10)(TetS)endA1 [dcm]	Expression der pGEX-Vektoren
Tierische Zelllinien			
HEK293	Graham et al., 1977	Embryonale Epithelzellen aus der Niere, <i>H. sapiens</i>	Expression der pcDNA3.1- und Fluoreszenz-Konstrukte

4.1.3 Plasmide

Die für diese Arbeit genutzten Plasmide sind in Tabelle Tabelle 4.2 aufgeführt und bildeten die Grundlage für alle verwendeten und klonierten Konstrukte (siehe jeweilige Kapitel, sowie Anhang).

Tabelle 4.2: Übersicht der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Hersteller	Besonderheit	Verwendung
pcDNA3.1/mycHisA	Invitrogen	C-terminaler myc- und His- <i>tag</i>	Expression in tierischen Zellen
pEGFP-C2	bdbioscience	N-terminaler GFP- <i>tag</i>	Lokalisationsstudien in tierischen Zellen
pEGFP-N1	Clontech	C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Lokalisationsstudien in tierischen Zellen
pmCherry-C1	Clontech	N-terminaler RFP- <i>tag</i>	Lokalisationsstudien in tierischen Zellen
pQE-80	Quiagen	N-terminaler His- <i>tag</i>	Proteinüberexpression in <i>E. coli</i>
pQE-30	Quiagen	N-terminaler His- <i>tag</i>	Proteinüberexpression in <i>E. coli</i>
pVL1393	Invitrogen	N-terminaler His- <i>tag</i>	Proteinüberexpression in Sf9 Zellen
pGEX-6P-1	GE Healthcare	N-terminaler GST- <i>tag</i>	Proteinüberexpression in <i>E. coli</i>
pGEX-2T	GE Healthcare	N-terminaler GST- <i>tag</i>	Proteinüberexpression in <i>E. coli</i>

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Klonierungstechniken

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden dienen der Modifikation, Mutation oder Vermehrung bereits vorhandener oder neu erstellter DNA-Fragmente (Tabelle 5.2). Dies erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (4.2.2), wobei daraus resultierende Amplifikate unter Verwendung spezifischer Restriktionsendo-nukleasen verdaut und in einen spezifischen Vektor ligiert wurden. Die erstellten Plasmide wurden nachfolgend dazu genutzt, spezifische Proteine in *E. coli* oder tierischen Zellen zu exprimieren, um diese für biochemische Analysen zu verwenden.

4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde in Anlehnung an Sambrook et al., 1989 durchgeführt. Dazu wurden bereits bestehende Plasmide oder cDNA als *template* eingesetzt, um daraus mit spezifischen Primern die gewünschten DNA-Fragmente zu amplifizieren. Die

verwendeten Primer enthielten spezifische Restriktionsschnittstellen, die es ermöglichen, das amplifizierte DNA-Fragment in einen gewünschten Zielvektor einzufügen. Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurde 2x RedTaq ReadyMix (SigmaAldrich) verwendet, wobei zur Reduktion der Fehlerrate weitere 2,5 Units der PWO-Polymerase (Peqlab), die eine *proofreading* Funktion besitzt, hinzugefügt wurden. Außerdem wurden 25-50 ng der *template* DNA sowie jeweils 25 pmol der spezifischen Primer eingesetzt. Das Standard-PCR-Programm setzte sich aus einer einmaligen Denaturierung für 5 min bei 95 °C, 25 Zyklen aus Denaturierung für 1 min bei 95 °C, Anlagerung der Primer für 1 min bei einer Temperatur, die 4 °C unter der Schmelztemperatur der spezifischen Primer liegt und Verlängerung des DNA-Fragmentes bei 72 °C für 1 min pro 1000 bp, gefolgt von einer Endsynthese von 10 min bei 72 °C zusammen. Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem T3 ThermoCycler (Biometra) durchgeführt.

Die Auftrennung der daraus resultierenden DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, wobei 1 %-ige Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 19 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0) mit Ethidiumbromid versetzt, verwendet wurde. Die DNA-Banden, die der richtigen Basenpaar-Größe entsprachen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des NucleoSpin Extract Kits (Macherey & Nagel) aus dem Gel extrahiert.

4.2.3 Mutagenese-PCR

Zum Einfügen spezifischer Punktmutationen in ein bereits bestehendes DNA-Konstrukt wurde das QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Hierzu waren spezielle Primer nötig, die sowohl die gewünschte Punktmutation als auch einen Teil der nicht-mutierten DNA-Sequenz vor und nach der Mutation enthielten. PCR-Ansatz und -Programm wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Nach erfolgreicher Mutagenese des gewünschten PCR-Fragmentes wurde dieses mit spezifischen, flankierenden Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor heraus geschnitten und in einen neuen, mit denselben Enzymen verdauten Vektor ligiert (4.2.4). Dies diente dazu, während der Mutagenese-PCR entstandene Mutationen in der Vektor-Sequenz zu eliminieren.

4.2.4 Restriktionsverdau und Ligation von PCR-Amplifikaten

Um die PCR-Amplifikate in einen spezifischen Expressionsvektor zu integrieren, wurde ein Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen sowohl vom Amplifikat als auch vom Zielvektor (Tabelle 4.2) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden die *Fast Digest* Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas verwendet. Die Art der Enzyme richtete sich nach den zuvor mittels PCR eingefügten oder im zu modifizierenden Konstrukt vorhandenen Restriktionsschnittstellen. Anschließend erfolgte die Ligation beider DNA-

Fragmente miteinander, wobei 1/10 Vektor-DNA und 7/10 Insert-DNA verwendet wurden. Des Weiteren wurden dem Ansatz 10x Ligasepuffer sowie 5 Units T4 DNA-Ligase (Fermentas) hinzugefügt. Nach 45-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Transformation des gesamten Ansatzes in kompetente *E. coli* DH5 α oder XL10 Gold Zellen (Tabelle 4.1). Die Überprüfung der daraus resultierenden Bakterienklone erfolgte mittels Kolonie-PCR. Hierzu wurden ein Vektor-spezifischer sowie ein Insert-spezifischer Primer verwendet und in einem 8 μ l Reaktionsansatz zusammen mit etwas Material der Bakterienkolonie einer PCR-Amplifikation unterzogen. Positive Klone, die das gewünschte Insert enthielten, wurden kultiviert und die DNA mittels des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey & Nagel) aufgereinigt. Zur vollständigen Überprüfung des Klonierungserfolges und der DNA-Sequenz wurde eine DNA-Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech durchgeführt.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte je nach Protein in unterschiedlichen Bakterienstämmen (Tabelle 4.1) standardmäßig in Luria-Bertani-(LB-) Medium (10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt pro Liter), dem entsprechend des verwendeten Plasmids Ampicillin (100 μ g/ ml) als Selektionsantibiotikum hinzugefügt wurde. Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 50 ml LB-Medium für 4-16 h bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend verwendet, um die Hauptkultur (1-1,5 L LB-Medium) zu starten. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 wurde die Proteinexpression mit 100 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 3-16 h bei 18-30 °C geschüttelt. Die geeigneten Expressionsbedingungen für die verschiedenen Proteine wurden zuvor mittels einer Testexpression ermittelt und sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3: Expressionsbedingungen verschiedener bakterieller Expressionskonstrukte.

Expressionskonstrukt	<i>E. coli</i> Stamm	Kultivierungstemperatur		IPTG [μ M]	Expressionsdauer nach Induktion, in h
		vor Induktion	nach Induktion		
pQE80-Gephyrin rC4	BL21	37 °C	18 °C	100	16-18
pQE30-Gephyrin rC4 P713E	BL21	37 °C	18 °C	100	16-18
pQE80-Gephyrin E-Domäne	BL21	30 °C	30 °C	100	16-18
pGEX-6P-1-GABA _A R-/ GlyR- β -Loop	ER2566	37 °C	22 °C	100	3-5

Nach der Expression wurden die Zellen mittels Zentrifugation 8 min bei 5.000 x g pelletiert und anschließend bei -20 °C zwischengelagert oder direkt zur weiteren Proteinaufreinigung verwendet.

4.3.2 Reinigung rekombinanter Proteine

Nach der Proteinexpression wurden die pelletierten Zellen in Lysispuffer aufgenommen und mittels eines Zell-Aufschluss-Systems (*Cell Disruptor*, Constant Systems) und eines Sonifizierers (Branson Digital Sonifier R 250 D) unter Kühlung mechanisch aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 35 min bei 39.000 x g wurde der lösliche Überstand für die weitere Proteinreinigung verwendet.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden der Proteinreinigung genutzt, die sich je nach Protein und dessen spezifischen *tag* (6x His- oder GST-*tag*) richteten. Ausgangsschritt war immer eine affinitätschromatographische Reinigung über eine Ni-NTA- (Gephyrin-Varianten) oder eine Glutathion-Matrix (GABA_AR- und GlyR- β -Loops). Um weitere Verunreinigungen zu entfernen, wurden zusätzliche Aufreinigungsschritte durchgeführt, die sich die Eigenschaften – wie Größe und/ oder isoelektrischer Punkt – des zu reinigenden Proteins zu Nutze machten. Dies umfasste die chromatographische Aufreinigung über eine oder mehrere Matrices unter Zuhilfenahme eines Chromatographie-Systems (Äkta Basic 10, GE Healthcare). Die jeweiligen Eluate wurden mittels des Systems fraktioniert und Protein-haltige Fraktionen mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Zur Ermittlung der Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurde eine SDS-PAGE (4.3.10) von einigen exemplarischen Fraktionen durchgeführt. Die entsprechenden Fraktionen wurden miteinander vereinigt und zur Erhöhung der Proteinkonzentration aufkonzentriert (4.3.7), bevor sie in kleinen Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

Alle zur Proteinreinigung verwendeten Puffer enthielten Protease-Inhibitor (Complete-Protease Inhibitor EDTA-free, Roche), sowie im Falle der Gephyrin-Reinigung zusätzlich 5 mM β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel.

4.3.3 Affinitätsreinigung 6-fach Histidin-markierter Proteine

Alle in *E. coli* exprimierten Gephyrin-Varianten (Tabelle 5.2) verfügten über einen N-terminalen 6x His-*tag* und konnten somit als ersten Schritt über eine Ni-NTA (Nitrilo-tri-Essigsäure)-Agarosematrix (Macherey & Nagel) aufgereinigt werden. Es wurden 2 ml Matrix je Liter Expressionskultur verwendet. Der Proteinrohextrakt (in Lysispuffer (25 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol) wurde entweder im Tropfverfahren zwei Mal über die Matrix gegeben oder im *batch*-Verfahren mit dieser für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend

wurde die Matrix mit 10 Säulenvolumen (SV) Lysispuffer gewaschen, bevor das gebundene Protein mit 3 SV Elutionspuffer (25 mM Tris/ HCl pH 8, 250 mM Imidazol) von der Matrix verdrängt und für weitere Reinigungsschritte verwendet wurde.

4.3.4 Affinitätsreinigung GST-fusionierter Proteine

Die verschiedenen Rezeptor-Loops (GABA_AR und GlyR) wurden als N-terminale GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine exprimiert. Glutathion-S-Transferasen (26 kDa; hier aus *Schistosoma japonicum*) sind eine ubiquitär vorkommende Proteingruppe, die mit hoher Affinität an Glutathion binden. Dadurch können Proteine mit GST-*tag* selektiv aus einem Proteingemisch aufgereinigt werden. Hierzu wurden pro Liter Expressionskultur 1 ml Glutathion-Agarose-4B-Matrix (Macherey & Nagel) verwendet und mit dem Rohlysat in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung; 137 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, pH 7,4) für 1 h im *batch*-Verfahren bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift von 10 SV mit PBS, bevor das gebundene Protein mit 4 SV Elutionspuffer (50 mM Tris/ HCl pH 8, 10 mM reduziertes Glutathion) in jeweils 10-minütigen Elutionsschritten von der Säule verdrängt wurde. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Eluat aufkonzentriert (4.3.7) und über eine Gelfiltrationssäule (4.3.5) der Größe nach aufgetrennt.

Aufgrund einer spezifischen Erkennungssequenz (LEVLFQGP) für die PreScission-Protease zwischen dem GST-*tag* und dem Fusionsprotein, war es alternativ möglich, das Eluat mit dieser Protease zu inkubieren. Dies diente dazu, ein gereinigtes Protein zu erhalten, das über keinen weiteren *tag* verfügt und somit in einer physiologischeren Weise vorliegt. Da es sich bei der Glutathion-S-Transferase um ein dimeres Protein handelt, kann dies die Eigenschaften der Fusionsproteine stark verändern und somit ist es gegebenenfalls wünschenswert ein nicht-markiertes Protein für weitere biochemische Analysen aufzureinigen. Hierzu wurde das Eluat aufkonzentriert (4.3.7) und mittels einer Gelfiltrationssäule in Spaltpuffer (50 mM Tris/ HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) umgepuffert (4.3.8). Anschließend erfolgte eine vierstündige Inkubation bei 4 °C mit 3 mg PreScission-Protease. Da es sich bei der PreScission-Protease ebenfalls um ein GST-Fusionsprotein handelt und um das abgespaltene freie GST, sowie nicht gespaltenes GST-Fusionsprotein aus dem Proteingemisch zu entfernen, wurde erneut eine Aufreinigung über Glutathion-Agarose-4B-Matrix durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im *batch*-Verfahren für 1 h bei 4 °C. Der ungebundene Überstand wurde aufgefangen und für eine weitere Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (4.3.5) verwendet.

4.3.5 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration dient der Proteinaufreinigung nach der Größe. Die Matrix einer Gelfiltrationssäule besteht aus einem porösen Trägermaterial definierter Porengröße, das die Eigenschaft besitzt, kleinere Proteine zurück zu halten, wohingegen größere Proteine relativ ungehindert hindurch wandern können. Somit können zum einen verschiedenen Proteine, aber auch verschiedene Oligomerisierungsformen eines einzelnen Proteins voneinander getrennt werden. Das Auftragen von Proteinen definierter Größe (*Gelfiltration Calibration Kit HMW*, GE Healthcare) ermöglicht die Kalibrierung der Säule und die Erstellung einer Eichgerade. Somit können die Molekulargewichte der einzelnen, eluierten Proteine anhand ihres Elutionszeitpunktes ermittelt werden. Je nach verwendetem Matrixmaterial können mittels einer Gelfiltrationssäule Proteine kleiner oder großer Größe besser voneinander getrennt werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Gelfiltrationssäulen mit unterschiedlichen Ausschlussgrößen verwendet: präparative Superdex 16/60 200 120 ml, Ausschlussgrenze 10-600 kDa (Säule 1: MW [kDa]: $103324 \cdot e^{-0,095 \cdot \text{Vol(ml)}}$; Säule 2: MW [kDa]: $74671 \cdot e^{-0,087 \cdot \text{Vol(ml)}}$); präparative Superdex 16/60 200 320 ml, Ausschlussgrenze 10-600 kDa (MW [kDa]: $41155 \cdot e^{-0,032 \cdot \text{Vol(ml)}}$); präparative Superdex 16/60 75 120 ml, Ausschlussgrenze 3-70 kDa (MW [kDa]: $2618,3 \cdot e^{-0,07 \cdot \text{Vol(ml)}}$).

Als Gelfiltrationspuffer wurde entweder ITC- (10 mM Tris/ HCl pH 8, 250 mM NaCl) oder Pulldownpuffer (20 mM Tris/ HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) verwendet.

4.3.6 Anionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie basiert auf ionischen Wechselwirkungen, die ein Protein bei einem bestimmten pH Wert aufgrund geladener Reste mit einer ebenfalls geladenen Matrix eingeht. Bei einer Anionenaustauschchromatographie binden die negativ geladenen Aminosäuren eines Proteins an das positiv geladene Säulenmaterial. Aufgrund der unterschiedlichen Ladung der verschiedenen Proteine in einem Gemisch binden einige nur schwach oder gar nicht an die Matrix, während andere sehr starke Interaktionen mit dieser eingehen. Diese Stärke der Bindung wird definiert durch den pH-Wert und die Ionenstärke des Puffers sowie den isoelektrischen Punkt des jeweiligen Proteins. Die verwendeten Gephyrin-Varianten und die Gephyrin E-Domäne weisen einen pI von 5,5 bzw. 5,4 auf und wurden über eine SourceQ15 Säule (7 oder 30 ml Säulenvolumen) aufgereinigt. Die Bindung an die Matrix erfolgte mittels SourceQ-Puffer A (50 mM Tris/ HCl pH 8). Mit diesem Puffer wurden auch schwache oder gar nicht gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Die sequentielle Elution der gebundenen Proteine erfolgte über eine schrittweise Erhöhung der Menge an SourceQ-Puffer B (50 mM Tris/ HCl pH 8, 1 M NaCl) und somit der Ionenstärke auf 50 % über 14 Säulenvolumen.

4.3.7 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Erhöhung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurden Amicon Ultra Zentrifugationsröhrchen der Firma Millipore mit einer Ausschlussgrenze von 3-50 kDa nach Herstellerangaben bei 4 °C verwendet.

4.3.8 Umpufferung mittels Gelfiltration

Für ITC- sowie Biacore-Messungen ist es notwendig, dass die verwendeten Proteine in exakt demselben Puffer vorliegen und dass dieser auch dem Laufpuffer entspricht. Erfolgte die Reinigung nicht bereits in diesem Puffer, so mussten die entsprechenden Proteine in diesen umgepuffert werden. Dies erfolgte nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie mittels PD10-Säulen (Sephadex G-25-Matrix, Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben.

4.3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Mittels UV/ Vis-Spektroskopie wurde das Spektrum einer reinen Proteinlösung in einem Cary 100 Bio Spektralphotometer (Varian) oder einem Nano Drop 1000 (Thermo Scientific) bestimmt. Mittels des Lambert-Beerschen-Gesetzes, der Absorption bei 280 nm, dem molaren Extinktionskoeffizienten (<http://web.expasy.org/protparam/>) und des Molekulargewichts konnte die genaue Proteinkonzentration ermittelt werden. Um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen, wurde der verdünnten Proteinlösung 0,1 % SDS hinzugefügt.

Die Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen in Organ- oder Zellrohextrakten erfolgte nach (Bradford, 1976) unter Verwendung des Bradford-Reagenzes (Roti-Quant, Roth). Das Reagenz wurde 1:5 mit Wasser verdünnt, das Proteinextrakt darin in einer Verdünnung von 1:1000 für 10 min inkubiert und in einem Spektralphotometer die Absorption bei 595 nm gemessen. Eine Eichgerade mit BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) ergab, dass eine Absorption von 1 einer Proteinkonzentration von 18 µg/ml entspricht, was im Folgenden der Auswertung zu Grunde gelegt wurde.

4.3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in diskontinuierlichen Tris/Glycin-Gelen mit einem Acrylamid-Gehalt von 6-17 % nach (Laemmli, 1970) ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dazu mussten die Proteinproben zuvor mit 5x SDS-Probenpuffer (50 % Glycerol, 3,5 % SDS, 15 % β -Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht

werden. Die Proben, sowie 10 µl des *Unstained Protein Molecular Weight Markers* bzw. 5 µl der *Page Ruler Prestained Plus Ladder* (beide Fermentas) wurden aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte unter Wasserkühlung mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS) bei 35-50 mA und nicht-limitierender Spannung pro Gel.

Zur Sichtbarmachung der spezifischen Proteinbanden wurde das Gel anschließend zunächst mit Coomassie-Färbelösung (40 % Methanol, 10 % Eisessig, 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G 250) ge- und anschließend mit Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Eisessig) entfärbt. Wurde das Gel nicht gefärbt, konnte es alternativ auch für eine Immun-Blot-Analyse (4.3.11) weiter verwendet werden.

4.3.11 Western Blot-Analyse von Proteinen

Die Western Blot-Analyse dient dem Nachweis immobilisierter Proteine mit spezifischen Antikörpern. Dazu mussten die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.3.10) aufgetrennten Proteine zunächst elektrophoretisch mittels einer *Semi-Dry* Blotapparatur (SemiDry Blotter EBU-4000 von C.B.C. Scientific Co.) auf eine spezifische Membran transferiert werden. Hierzu wurde eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF)-Membran (Macherey & Nagel) verwendet. Diese musste für einige Sekunden in Methanol aktiviert werden, bevor sie genau wie das SDS-PA-Gel und sechs Scheiben Whatman-Papier in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol) äquilibriert wurde. Das SDS-PA-Gel wurde flankiert von je drei Whatman-Papier so in die Blotapparatur eingespannt, dass die Übertragung der negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung des Pluspols auf die Membran erfolgte. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 1,5-2 mA pro Quadratcentimeter SDS-PA-Gel und Stunde.

Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran mit den transferierten Proteinen zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBST (10 mM Tris/ HCl pH 7,4, 154 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) blockiert. Die Erstantikörper-Inkubation (Tabelle 4.4) folgte anschließend für eine weitere Stunde in 1 % Milchpulver in TBST bei RT oder alternativ bei 4 °C über Nacht. Die darauf folgenden Waschschriffe richteten sich nach dem zu nutzenden Entwicklungssystem und daraus resultierend nach den verwendeten Sekundärantikörpern (Tabelle 4.4). Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1 % Milchpulver in TBST. War der Zweit-Antikörper mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, so erfolgte sowohl vor als auch nach der Inkubation ein 15-minütiger Waschschriff mit TBST, gefolgt von einem 10-minütigen Waschschriff mit 0,8 % Natriumchlorid (NaCl). Die Entwicklung erfolgte mittels einer Farbreaktion. Diese wurde hervorgerufen durch die Reaktion von 5-Brom-4-Chlor-indolylphosphat (BCIP) und Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT, beides Appllichem) in AP-

Reaktionspuffer (100 mM Tris/ HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit der an den sekundären Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase (AP). Die AP katalysiert dabei die Umsetzung des BCIPs zu einem unlöslichen Farbstoff, der sich auf der Membran niederschlägt, wohingegen NBT als Farbverstärker agiert. Die Inkubationsdauer richtete sich nach der gewünschten Intensität der Proteinbanden und somit auch nach der Proteinmenge auf der Membran. Sobald jedoch die Membran eine Hintergrundfärbung aufwies, wurde die Färbereaktion durch Spülen der Membran mit H₂O abgestoppt.

Alternativ konnte der Nachweis der spezifischen Proteinbanden mittels Chemolumineszenz (*enhanced chemiluminescence*, ECL) erfolgen. Dazu wurden Zweitantikörper verwendet, die anstelle der AP das Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt haben. In diesem Falle erfolgten alle Waschschrte mit TBST. Ausschließlich direkt vor der Entwicklungsreaktion erfolgte ein einmaliges Waschen mit TBS (TBST ohne Tween 20). Die Sichtbarmachung der durch den Antikörper detektierten Proteinbanden erfolgte durch eine chemische Reaktion, bei der die HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, wobei eine Chemolumineszenz entsteht. Diese kann mit einer gekühlten CCD-Kamera (Cool Snap HQ², Photometrics) detektiert und mittels der Software GelPro Analyzer 6.0 (MediaCybernetics) visualisiert werden.

Tabelle 4.4: Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper.

Antikörper	Referenz	Antigen	Organismus	Verdünnung
Primärantikörper				
mAK 3B11	Smolinsky et al., 2008	Gephyrin E-Domäne (399-438)	Maus	1:20 (Zü) ¹
Sekundärantikörper				
Goat-anti-mouse AP ²	Sigma	Maus	Ziege	1:3.000
Goat-anti-mouse HRP ³	Santa Cruz	Maus	Ziege	1:3.000

¹ Zü = Zellkulturüberstand

4.3.12 Herstellung von Organ-Rohextrakten

Für Kosedimentations-Analysen (4.4.1) wurden Gesamtproteinextrakte aus dem Hirn benötigt. Hierzu wurde das gesamte Gehirn aus adulten Wildtyp-Mäusen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Erstellung des Proteinextraktes wurde ein einzelnes Gehirn mit einem Skalpell grob zerkleinert, in Puffer (0,1 M Tris/ HCl pH 8, 0,3 % Triton X-100) transferiert und mittels eines Potter S Homogenisators (Sartorius) homogenisiert und anschließend sonifiziert. Der daraus resultierende Rohextrakt wurde bei

21.000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der lösliche Überstand für weitere Experimente eingesetzt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der Bradford-Methode (4.3.9). Um Proteinabbau vorzubeugen, wurde dem Puffer Proteaseinhibitor (Roche) zugefügt. Je nach Versuchsansatz wurde außerdem PhosStop (Roche) verwendet, um die Dephosphorylierung durch Phosphatasen zu inhibieren.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Kosedimentations-Analyse mit GST-fusionierten Proteinen

Für die Kosedimentations-Analyse mit GST-fusionierten GABA_AR- und GlyR-β-Loops wurden diese zunächst analog zur Reinigung GST-fusionierter Proteine (4.3.4) an Glutathion-Agarose immobilisiert. Dazu wurden Zellen aus 0,75-1,5 L Expressionskultur (4.3.1) in PBS aufgeschlossen und der lösliche Proteinüberstand im *batch*-Verfahren mit 400 µl Matrix für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die mit den GST-Rezeptor-Loops gekoppelten Agarose-Beads wurden mit 30 SV PBS gewaschen und in demselben Puffer mit zusätzlichem Proteaseinhibitor gelagert. Aliquots dieser Rezeptor-Loop-Beads wurden auf einem SDS-PA-Gel separiert und Coomassie-gefärbt (4.3.10), um die Ladekapazität sowie Qualität zu quantifizieren.

Die Kosedimentations-Experimente (Pulldowns) wurden abhängig von der Saturierung mit 5-25 µl Rezeptor-Loop-beladener Glutathion-Agarose durchgeführt. GST-beladene Beads wurden dabei als Negativkontrolle verwendet. Die Proben wurden mit 500 pmol der verschiedenen, gereinigten Gephyrin-Varianten, mit 400 µg Hirn-Rohextrakt oder 500 µg HEK293-Zellrohextrakt für 30 min unter leichtem Schütteln bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 80 µl (aufgefüllt mit Pulldownpuffer (20 mM Tris/ HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)) inkubiert. Die Beads wurden bei 2.000 rpm für 4 min sedimentiert. Der Überstand mit den ungebundenen Proteinen wurde abgenommen und mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurden die Pellets vier Mal mit 1 ml Waschpuffer (20 mM Tris/ HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Anschließend folgte die Abspaltung der gebundenen Proteine von der Matrix durch Zugabe von 50 µl 1x SDS-Ladepuffer und Aufkochen für 10 min bei 95 °C. Die einzelnen Proben (jeweils 14 µl) wurden mittels eines SDS-PA-Gels analysiert und anschließend Coomassie-gefärbt (4.3.10) oder einer Western Blot-Analyse (4.3.11) unterzogen.

4.4.2 *In vitro* Phosphorylierungsstudien

Die *in vitro* Phosphorylierungsstudien wurden genutzt, um einen möglichen Effekt der GABA_AR-Loop Phosphorylierung auf die Stärke der Gephyrinbindung zu untersuchen. Die GST-fusionierten Rezeptor-Loops wurden in *E. coli* exprimiert und liegen daher unphosphoryliert vor und konnten unter Verwendung von Hirnlysate oder gereinigten Kinasen (ProKinasen) und ATP phosphoryliert werden.

Der Einsatz der gereinigten Kinasen (PKC β 1, δ und γ) erfolgte nach Herstellerangaben. Die GST-fusionierten und an Glutathion-Agarose immobilisierten Rezeptor-Loops wurden mit den Kinasen im entsprechenden Reaktionspuffer (Herstellerangaben) mit 5 μ M (PKC β 1, δ) bzw. 20 μ M (PKC γ) ATP für 45 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen mit PBS, bevor die phosphorylierten Rezeptor-Loop Beads für eine Kosedimentations-Analyse mit Hirnrohextrakt oder gereinigtem Gephyrin eingesetzt wurden.

Da nicht alle vermeintlichen Kinasen für die zu untersuchenden Phosphorylierungsstellen als gereinigte Kinasen zur Verfügung standen, wurde zusätzlich eine *in vitro* Phosphorylierung mittels Hirnrohextrakts durchgeführt. Dieses enthält alle im Gehirn vertretenen Kinasen, die unter Zugabe von ATP sowie Mg²⁺ als Kofaktor spezifisch die Rezeptor-Loops phosphorylieren können. Hierzu wurde, wie in 4.3.7.1 beschrieben, eine Kosedimentations-analyse mit Hirnlysate durchgeführt, wobei zusätzlich Kinasepuffer (0,3 M MgCl₂, 10 mM DTT, 50 mM Tris/ HCl pH 7,5), sowie 5 mM ATP zugefügt wurden, um eine Phosphorylierung zu ermöglichen. Je Rezeptor-Loop-Konstrukt wurde ein Ansatz mit und ohne ATP durchgeführt, um mögliche Phosphorylierungs-abhängige Unterschiede aufzeigen zu können.

4.4.3 Analytische Gelfiltration

Zur weiteren Überprüfung der direkten Bindung zwischen GABA_AR-Loops und Gephyrin sowie zur Ermittlung der Stöchiometrie dieser Bindung wurden neben den Kosedimentations-Analysen analytische Gelfiltrationsläufe durchgeführt. Hierzu wurde zum einen eine kalibrierte Superdex 200 10/300 GL mit einem Säulenvolumen von 25 ml und einer Ausschlussgrenze von 10-600 kDa (MW [kDa]: $74902 \cdot e^{-0,518 \cdot \text{Vol(Laemmli)}}$) an einer Äkta Basic 10 verwendet. Die äquilibrierte Säule wurde mit 200 μ l Proteinprobe in Pulldown-Puffer (20 mM Tris/ HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) beladen und diese bei einer Flussrate von 0,5 ml/min ihrer Größe nach aufgetrennt. Zum anderen wurde eine Sec Acquity BEH200 Säule (Waters, 1,7 μ m Partikelgröße; 4,6 x 150 mm, 2,4 ml SV) unter Verwendung einer HPLC (Agilent) genutzt. Hier wurden 0,5 μ l der gereinigten Proteinproben injiziert und mit einer Flussrate von 0,3 ml/min in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 bzw. 7,5 der Größe nach aufgetrennt. In beiden Fällen wurden definierte Mengen an GABA_AR-Rezeptor-Loop

(kompletter, sowie verkürzter Loop) mit und ohne GST-Fusion, sowie gereinigtes Gephyrin rC4 aus *E. coli* eingesetzt. Um eine Aussage über die Bindung treffen zu können, wurden zunächst die einzelnen Proteine separat aufgetrennt und anhand der Kalibriergerade deren Molekulargewicht und Oligomerisierungsverhalten bestimmt. Anschließend erfolgte die Inkubation beider Proteine bei RT. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben der inkubierten Proteine aufgetrennt und analysiert. Eine Veränderung der Gephyrin-Elution, sowie die Zunahme des Gephyrin- und die Abnahme des Rezeptor-Loop-Peaks nach Vorinkubation wurde als ein Hinweis auf eine direkte Bindung zwischen den jeweiligen Proteinen gewertet. Als Positivkontrolle wurde der GlyR- β -Loop unter vergleichbaren Bedingungen untersucht.

4.4.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung dient der Ermittlung des Stokes' Radius sowie der Größe von Proteinen in einer Proteinlösung. Es können somit Aussagen über den Oligomerisierungsstatus von Proteinen sowie deren Stabilität unter verschiedenen Bedingungen ermittelt werden. Gemessen wird eine Zeit-abhängige Fluktuation in der Streuungsintensität, die auf Brown'scher Molekularbewegung basiert. Dadurch ändert sich die Distanz zwischen den verschiedenen Molekülen in der Lösung konstant über die Zeit, wobei sich kleine Moleküle schneller bewegen als große.

Gemessen wurden gereinigte Proteinlösungen von Gephyrin oder den verschiedenen Rezeptor-Loops mit oder ohne GST-tag in einem Konzentrationsbereich von 1-5 mg/ml. Die Messungen erfolgten mittels eines DynaPro dynamischen Lichtstreuers (Proterion) und der Dynamics V6 Software (Biostad). Messpunkte wurden alle 10 Sekunden über einen Zeitraum von 4 min genommen. Die Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls mit der Dynamics V6 Software und gab Auskunft über das ermittelte Molekulargewicht, den Prozentanteil der Polydispersität (<15 % homogen, >15 % polydispers), sowie die Prozentzahl der Masseanteile an der Gesamtmasse (>99 % monomodal, größere Aggregate können vernachlässigt werden; <99 % multimodal, viele große, unspezifische Aggregate enthalten).

4.4.5 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Mittels der isothermalen Titrationskalorimetrie ist es möglich, Protein-Protein-Wechselwirkungen zu analysieren, indem Parameter wie Stöchiometrie der Bindung (n), die Assoziations (K_A)-, sowie Dissoziationskonstante (K_D) und die freigesetzte Wärme pro Mol Bindungspartner (ΔH) über die Bindungswärme ermittelt werden. In dieser Arbeit sollten die Bindungsparameter für die Bindung zwischen Gephyrin und dem GABA_AR- $\beta 2$ (kompletter, sowie verkürzter Loop) mit und ohne GST-Fusion ermittelt werden. Dazu mussten beide

Proteinlösungen in demselben Puffer vorliegen und wurden daher entweder direkt in diesem gereinigt oder mittels Gelfiltration nachträglich umgepuffert (4.3.8). Der Analyt wurde in einem Konzentrationsbereich von 15-30 μM und der Ligand von 200-1000 μM eingesetzt. Das Injektionsvolumen des Liganden betrug dabei 8-12 μl pro Injektion. Standardmäßig wurde Gephyrin als Analyt und die verschiedenen Rezeptor-Loops als Ligand in ITC-Puffer (10 mM Tris/ HCl pH 8, 250 mM NaCl) eingesetzt. Aufgrund von Hintergrundreaktionen und daraus resultierenden Problemen wurde der Puffer gewechselt (60 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4, 150 mM NaCl) sowie Gephyrin als Ligand und der Rezeptor-Loop als Analyt verwendet.

Vor Versuchsbeginn wurden beide Proteinlösungen für 10 min bei 21.000 x g und 4 °C abzentrifugiert und für 10 min entgast. Die Messungen wurden mit einem VP-ITC (MicroCal) bei 25 °C durchgeführt und mit Hilfe des Programms Origin7 (MicroCal) ausgewertet.

4.4.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR)

Um die Bindung zwischen Gephyrin und dem GABA_AR- β 2 Loop genauer spezifizieren zu können, wurden Interaktionsstudien an einem Biacore X100 (GE Healthcare) durchgeführt. Dazu wurde Gephyrin (in Natrium-Acetat-Puffer pH 4,5) kovalent mittels Aminkopplung an die zweite Flusszelle eines Carboxymethyl-dextran-Hydrogel Sensorchips unter Verwendung von HBS-EP+ (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005 % TWEEN-20, 3 mM EDTA) als Laufpuffer nach Herstellerangaben gekoppelt. Freie Bindungsstellen wurden blockiert, um unspezifische Bindung des Analyten zu verhindern. Die blockierte Oberfläche der ersten Flusszelle diente als Kontrolle.

Die Messungen wurden bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ in Messpuffer (20 mM Tris/ HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), unter Verwendung verschiedener Konzentrationen des Analyten, durchgeführt. Als Analyt (Injektionsvolumen 10 μl) diente der GABA_AR- β 2-Loop (komplett und verkürzt) als GST-Fusion, sowie der GST-GlyR- β -Loop als Positiv- und GST als Negativkontrolle. Die Regeneration des Sensorchips erfolgte nach jedem Zyklus mit 10 mM Glycin/ HCl pH 3.

Für SPR-Messungen mit einem biotinylierten Peptid, das die Gephyrin-Bindesequenz der GABA_AR- β 2-Untereinheit (Reste 390-420) trug, wurde ein Streptavidin Sensorchip verwendet. An diesen bindet das biotinylierte Peptid über das angefügte Biotin mit hoher Sensitivität, was eine zur kovalenten Kopplung vergleichbaren Bindung entspricht. Sowohl die Kopplung des Peptids (4000 RU), als auch die Messungen wurden in PBS mit zusätzlichen 0,005 % TWEEN-20 durchgeführt. Als Analyt wurde gereinigtes Gephyrin-rC4c in einem Konzentrationsbereich von 0-80 μM eingesetzt.

Die Auswertung wurde nach Subtraktion der resultierenden relativen Resonanzeinheiten aus Flusszelle 1 von denen aus Flusszelle 2 mittels des Programms BIAevaluation (GE Healthcare) durchgeführt.

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen (Tabelle 4.1) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit zusätzlichem Glutamin (2 mM) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Beide Zelllinien wuchsen adhärent, in einem *Monolayer*, auf Kulturschalen mit einer angeätzten Oberfläche (Sarstedt). Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche unter der Verwendung von Trypsin/ EDTA passagiert und dabei je nach Dichte vierfach oder achtfach verdünnt.

4.5.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die transiente Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte zur Überexpression verschiedener GABA_AR-Untereinheiten, wobei der intrazelluläre Loop oder der holo-Rezeptor exprimiert wurden. Des Weiteren wurden verschiedene Gephyrin-Varianten im pEGFP-C2-Vektor verwendet.

Die Zellen wurden entweder auf 10 cm Kulturschalen transfiziert, um sie anschließend zu ernten und biochemische Versuche durchzuführen oder wurden in mit Deckgläschen bestückten 12-Well-Schalen für mikroskopische Präparate transfiziert. Für eine bessere Anhaftung der Zellen wurden die Deckgläschen zuvor mit Collagen (0,5 mg/ml in H₂O) beschichtet, um eine bessere Oberfläche für das Wachstum zu schaffen.

Die genaue Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und anschließend wurden verschiedene Mengen von HEK293-Zellen ausgesät (Tabelle 4.5) und bei einer Konfluenz von 60-80 % transfiziert. Die Transfektion auf Deckgläschen erfolgte mittels 1,5 µl des Transfektionsreagenzes FuGENE6 (Roche). Dieses wurde mit Serum-freiem Medium 5 min vorinkubiert, bevor 0,5 µg gereinigte Plasmid-DNA hinzugefügt wurde und eine weitere Inkubation von 20 min folgte. Die Lösung wurde zu den am Vortag ausgesäten Zellen gegeben und 36 h mit diesen inkubiert. Für Co-Transfektionen wurden ebenfalls 0,5 µg DNA pro Konstrukt eingesetzt, wobei die Menge des Transfektionsreagenzes auf 2 µl bzw. 2,5 µl bei Dreifach-Transfektionen erhöht wurde.

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen auf 10 cm Schalen erfolgte mittels des Transfektionsreagenzes Polyethylenimine (PEI). Hierzu wurden 30 µl PEI mit 600 µl Serumfreiem Medium 5 min vorinkubiert, bevor 10 µg der zu exprimierenden Plasmid-DNA hinzugefügt wurden. Nach erneuter 20-minütiger Inkubation wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben und diese nach 36-stündiger Expression geerntet.

Tabelle 4.5: Angaben zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen.

Zelltyp	Kulturschale	Zellzahl	Transfektionsreagenz
HEK293	12er Well	90.000	FuGENE6
HEK293	10 cm Schale	4.500.000	PEI

4.5.3 Herstellung mikroskopischer Präparate und Mikroskopie von HEK293-Zellen

Die auf Deckgläschen gewachsenen und mit Fluoreszenzproteinen gekoppelten Konstrukten transfizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, sowie mit H₂O. Die Deckgläschen wurden mittels eines Tropfens Mowiol-Dabco-Lösung (10 % Mowiol gelöst in 25 % Glycerin und 0,1 M Tris pH 9,0, versetzt mit 2,5 % Dabco (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)) mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger fixiert und über Nacht bei 4 °C ausgehärtet, bevor sie zur Mikroskopie verwendet werden konnten.

Die mikroskopische Analyse der erstellten Präparate erfolgte mit einem Ti-Eclipse inversen Forschungsmikroskop der Firma Nikon. Das Mikroskop war mit einer zusätzlichen, konfokalen Lasereinheit ausgestattet und verfügte über Laser der Wellenlängen 405, 488 und 543 nm. Die dazu gehörigen Detektoren umfassten ein Wellenlängen-Spektrum von 450/35, 515/30 und 605/75 nm. Die verwendeten Objektive waren ein CFI Planapochromat 40-fach mit einer numerischen Apertur von 0,95 und ein CFI Planapochromat 60-faches Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,40. Die Bilder wurden mit der Nikon-spezifischen EZ-C1-Software aufgenommen und bearbeitet.

4.5.4 Ernte und Aufschluss transfizierter HEK293-Zellen

Auf 10 cm Schalen kultivierte und transfizierte HEK293-Zellen wurden 2-3 Tage nach der Transfektion geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin/ EDTA von den Kulturschalen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 min bei 1.000 rpm/min pelletiert. Anschließend

wurde die Flüssigkeit abgenommen und das Pellet weitere zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Nach dem Auftauen des Zellpellets wurde dieses in $400\text{ }\mu\text{l}$ PBS aufgenommen und der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Sonifizierers für zweimal 10 Sekunden bei 40 % Aktivität. Um Zelltrümmer vom löslichen Überstand zu trennen, wurde die Suspension für 20 min bei 21.000 x g abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration des löslichen Überstandes wurde mittels Bradford-Reagenz (4.3.9) ermittelt und für Kosedimentations-Analysen (0) eingesetzt.

5 Anhang

5.1 Primer

Tabelle 5.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Primer	Beschreibung	Sequenz
GABA- α 1-for <i>EcoRI</i>	GABA _A R- α 1 mit His-tag	TCCGAATTCGGAATGAAGAAAAGTCGGGGTC TC
GABA- α 1-rev <i>NotI</i>	GABA _A R- α 1 mit His-tag	ATAGTTTAGCGGCCGCTCAGTGATGGTGATG GTGATGTTGATGGGGTGTGGGGGCTTT
GABA- β 2 337 for <i>BamHI</i>	Trunkierter GABA _A R- β 2 Loop	GGTGATGGATCCGACCCCATGAGAACAT
GABA- β 2 388 rev <i>EcoRI</i>	Trunkierter GABA _A R- β 2 Loop	GGCGGCGAATTCTCAACTATGCCTAGGCAG
GABA- β 2 430 rev <i>EcoRI</i>	Trunkierter GABA _A R- β 2 Loop	GGCGGCGAATTCTCAGCGAGACCAGCGATC
GABA- β 2 320 for <i>BamHI</i>	Trunkierter GABA _A R- β 2 Loop	GGTGATGGATCCAAAGCTGCTAATGCCAAC
pHluorin for <i>AgeI</i>	Erstellung von pHluorin-N1	TCCACCGGTCGCCACCATG GGAAGTAAAGGAGA
pHluorin rev <i>NotI</i>	Erstellung von pHluorin-N1	GAGTCGCGGCCGCTTTATTTGTATAGTTCAT CC
GABA- α 1-FLAG rev <i>NotI</i>	GABA _A R- α 1 in pcDNA- mycHisA	TCGAGCGGCCGCTCACTTATCATCATCATCC TTGTAATCTTGATGGGGTGTGGGGGCTTTTA G
pHluorin-GABA- β 2 for <i>XhoI</i>	GABA _A R- β 2 in pHluorin-N1	CATCTCGAGCAT ATGTGGAGAGTCCGG
pHluorin-GABA- β 2 rev <i>BamHI</i>	GABA _A R- β 2 in pHluorin-N1	CGCGGATCCTGGCGGTTACATAGTAAAG
GABA _A R- β 2 Mutagenese 392-399 for	Mutagenese des GABA _A R- β 2 Loops	CTGCCTAGGCATAGTTTTGGCCGCGGCGCT GGGGCGGGAGCTGGGGCACAAAAGAAAAGT CGCCTG
GABA _A R- β 2 Mutagenese 392-399 rev	Mutagenese des GABA _A R- β 2 Loops	CAGGCGACTTTTCTTTTGTGCCCCAGCTCCC GCCCCAGCGCCGCGGCCAAAAGTATGCCTA GGCAG
GABA _A R- β 2 Mutagenese 400-405 for	Mutagenese des GABA _A R- β 2 Loops	CGCAACGCTCTGGAGCGACATGTGGCAGCA GGGGCAGGTGCCGGGAGGAGACGTGCCTC CCAA
GABA _A R- β 2 Mutagenese 400-405	Mutagenese des GABA _A R- β 2 Loops	TTGGGAGGCACGTCTCCTCCCGGCACCTGC CCCTGCTGCCACATGTCGCTCCAGAGCGTT

rev		GCG
GABA _A R-β2 S410D for	Mutagenese des GABA _A R-β2 Loops	CCTGAGGAGACGTGCCGACCAACTGAAAAT CAC
GABA _A R-β2 S410D rev	Mutagenese des GABA _A R-β2 Loops	GTGATTTTCAGTTGGTCGGCAGCTCTCCTCA GG
GABA _A R-β2 S410A for	Mutagenese des GABA _A R-β2 Loops	CCTGAGGAGACGTGCCGCCCAACTGAAAAT CAC
GABA _A R-β2 S410A rev	Mutagenese des GABA _A R-β2 Loops	GTGATTTTCAGTTGGGCGGCAGCTCTCCTCA GG
GABA _A R-β2 306 for <i>BamHI</i>	Trunkierter GABA _A R-β2 Loop	GGTGATGGATCCTTCTTTGGGAGAGGACCC CA
GABA _A R-β2 Mutagenese 392-405 for	Mutagenese des GABA _A R-β2 Loops	GGCCGCGGCGCTGGGGCGGGAGCTGGGGC AGCAGGGGCAGGTGCCGGGAGGAGACGTG CCTCCCAA
GABA _A R-β2 Mutagenese 392-405 rev	Mutagenese des GABA _A R-β2 Loops	TTGGGAGGCACGTCTCCTCCCGGCACCTGC CCCTGCTGCCCCAGCTCCCGCCCCAGCGCC GCGGCC
GABA _A R-β2 Δ390-420 rev	Deletion des GABA _A R-β2 Loops	GGCGTTCACATCAAACTATGCCTAGGCAAC CCAGC
GABA _A R-β2 Δ390-420 for	Deletion des GABA _A R-β2 Loops	TTGCCTAGGCATAGTTTTGATGTGAACGCCA TTGATCGGTGGTCCCGC
GABA _A R-β2/3 for <i>XhoI</i>	GABA _A R-β2/3 Loop in pEGFP-N1	CCGCTCGAGCGGATG TTCTTTGGGAGAGGACCCAG
GABA _A R-β2/3 rev <i>BamHI</i>	GABA _A R-β2/3 Loop in pEGFP-N1	CGCGGATCCGCGTAGCGGGACCACCGATCA ATGGC
GABA _A R-β1 for <i>XhoI</i>	GABA _A R-β1 Loop in pEGFP-N1	CCGCTCGAGCGGATG TTCTTCGAAAAGGCCCTCAG
GABA _A R-β1 rev <i>BamHI</i>	GABA _A R-β1 Loop in pEGFP-N1	CGCGGATCCGCGTACATTCGGGACCACTTG TC
GABA _A R-γ2 for <i>XhoI</i>	GABA _A R-γ2 in pEBFP-C1	CCGCTCGAGCGGATATGGTCAGCAACCGGA AGCCAAGC
GABA _A R-γ2 rev <i>BamHI</i>	GABA _A R-γ2 in pEBFP-C1	CGCGGATCCGCGAGTCCATTTGGCAATGC G
GABA _A R-β3 420 rev <i>EcoRI</i>	Trunkierter GABA _A R-β3 Loop	GGCGGCGAATTCTCAGGTTAGATCAGGGATT TT
GABA _A R-β2-myc <i>NotI</i>	GABA _A R-β2 mit myc-tag	ATAGTTTAGCGGCCGCTTGTTCACATAGTAA AGCCA
GABA _A R-β2-HA rev <i>XhoI</i>	GABA _A R-β2 mit HA-tag	CTCGAGTCATGCGTAGTCCGGTACATCGTAC GGGTAGTTCACATAGTAAAGCCAATAGACGA TGTT
GlyR-β 378-413 for <i>BamHI</i>	Trunkierter GlyR-β Loop	CGCGGATCCGCG GTTGGTGAGACCAGATGCAAA

GlyR- β 378-413 rev <i>EcoRI</i>	Trunkierter GlyR- β Loop	CCGGAATTCGGTCAATAATTGGATAATTCA AA
---	--------------------------------	--------------------------------------

Für die DNA-Sequenzierung wurden in der Regel Standardprimer der Firma GATC Biotech verwendet und sind daher hier nicht aufgeführt.

5.2 Konstrukte

Tabelle 5.2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.

Konstrukt	Vektor	Quelle	Enzyme	Zusatz	Größe des Fusionsproteins
GlyR β -Loop (329-455)	pGEX-2T	Meier		GST-tag	42,8 kDa
GlyR β -Loop (378-413)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	BamHI/ EcoRI	GST-tag	30,9 kDa
GABA _A R α 1-holo-His	pcDNA3.1mycHisA	diese Arbeit	EcoRI/ NotI	His-tag	52,6 kDa
GABA _A R α 1-holo-FLAG	pcDNA3.1mycHisA	diese Arbeit	EcoRI/ NotI	FLAG-tag	52,8 kDa
GABA _A R α 1-Loop (310-392)	DsRed	Meier 2008	BamHI/ NcoI	RFP-tag	37,5 kDa
GABA _A R α 1-Loop (310-392)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST-tag	38,2 kDa
GABA _A R α 2-Loop	DsRed	Meier 2008	EcoRI/XbaI	RFP-tag	37,8 kDa
GABA _A R α 2-Loop (310-394)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST-tag	38,5 kDa
GABA _A R α 5-Loop	DsRed	Meier 2008	EcoRI/ NcoI	RFP-tag	38,1 kDa
GABA _A R β 1-Loop	pEGFP-N1	diese Arbeit	BamHI/ XhoI	GFP-tag	41,8 kDa
GABA _A R β 2-holo-His	pcDNA3.1mycHisA	diese Arbeit	EcoRI/ NotI	His-tag	55,5 kDa
GABA _A R β 2-holo-myc	pcDNA3.1mycHisA	diese Arbeit	KpnI/ NotI	myc-tag	55,8 kDa
GABA _A R β 2-holo-HA	pcDNA3.1mycHisA	diese Arbeit	KpnI/ XhoI	HA-tag	55,7 kDa
GABA _A R β 2-holo-pHluorin	pHluorin-N1	diese Arbeit	XhoI/ BamHI	pHluorin-tag	82,3 kDa
GABA _A R β 2-holo	pEGFP-N1	diese Arbeit	XhoI/ BamHI	GFP-tag	82,3 kDa
GABA _A R β 2-Loop (306-430)	pEGFP-N1	diese Arbeit	XhoI/ BamHI	GFP-tag	42,1 kDa
GABA _A R β 2-Loop (306-430)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST-tag	43,3 kDa

GABA _A R β 2-Loop (306-400)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST-tag	37,8 kDa
GABA _A R β 2-Loop (361-400)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST-tag	31,6 kDa
GABA _A R β 2-Loop (337-420)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	36,3 kDa
GABA _A R β 2-Loop (320-430)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	40,9 kDa
GABA _A R β 2-Loop (337-388)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	32,5 kDa
GABA _A R β 2-Loop (337-430)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	37,5 kDa
GABA _A R β 2-Loop (390-408)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	29,0 kDa
GABA _A R β 2-Loop (396420)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	29,9 kDa
GABA _A R β 2-Loop (383-400)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	30,1 kDa
GABA _A R β 2-Loop (390-430)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	31,7 kDa
GABA _A R β 2-Loop (390-420)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	30,4 kDa
GABA _A R β 2-Loop (306-430; 392-399 mutagenisiert)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	44,5 kDa
GABA _A R β 2-Loop (306-430; 400-405 mutagenisiert)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	44,5 kDa
GABA _A R β 2-Loop (306-430; 392-405 mutagenisiert)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	44,5 kDa
GABA _A R β 2-Loop Δ 390-420	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	40,9 kDa
GABA _A R β 2-Loop S410A (306-430)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	44,5 kDa
GABA _A R β 2-Loop S410D (306-430)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST-tag	44,5 kDa
GABA _A R β 3-Loop (306-428)	pEGFP-N1	diese Arbeit	XhoI/ BamHI	GFP-tag	41,9 kDa
GABA _A R β 3-Loop (306-428)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST-tag	43,1 kDa
GABA _A R β 3-Loop (390-	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/	GST-tag	29,0 kDa

408)			BamHI		
GABA _A R β3-Loop (390-420)	pGEX-6P-1	diese Arbeit	EcoRI/ BamHI	GST- <i>tag</i>	30,5 kDa
GABA _A R γ2-holo-His	pcDNA3.1mycHisA	diese Arbeit	BamHI/ NotI	His- <i>tag</i>	54,9 kDa
GABA _A R γ2-holo-pHluorin	pHluorin-N1	diese Arbeit	XhoI/ BamHI	pHluorin- <i>tag</i>	84,4 kDa
GABA _A R γ2S-Loop (312-403)	pEBFP-C1	diese Arbeit	XhoI/ BamHI	BFP- <i>tag</i>	
GABA _A R γ2S-Loop (321-403)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST- <i>tag</i>	38,8 kDa
GABA _A R γ2S-Loop S355D	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST- <i>tag</i>	38,8 kDa
GABA _A R γ2S-Loop S327D	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST- <i>tag</i>	38,8 kDa
GABA _A R γ2L-Loop (321-411)	pEBFP-C1	diese Arbeit	XhoI/ BamHI	BFP- <i>tag</i>	
GABA _A R γ2L-Loop (321-411)	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST- <i>tag</i>	39,8 kDa
GABA _A R γ2L-Loop S327D	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST- <i>tag</i>	39,8 kDa
GABA _A R γ2L-Loop S343D	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST- <i>tag</i>	39,8 kDa
GABA _A R γ2L-Loop S355D	pGEX-6P-1	Meier 2008	XmaI	GST- <i>tag</i>	39,8 kDa
rGephyrin C4c	pQE80	Belaidi	XmaI/ NotI	His- <i>tag</i>	83,0 kDa
rGephyrin	pVL1393	Herweg	XmaI/ NotI	His- <i>tag</i>	84,5 kDa
rGephyrin C3	pVL1393	Herweg	XmaI/ NotI	His- <i>tag</i>	86,0 kDa
rGephyrin C4c	pVL1393	Herweg	XmaI/ NotI	His- <i>tag</i>	85,0 kDa
rGephyrin C4c P713E	pQE30	Otte 2004	KpnI	His- <i>tag</i>	83,3 kDa
rGephyrin C4c	pEGFP-C2	Kim 2006	EcoRI/ XhoI	GFP- <i>tag</i>	110,0 kDa
rGephyrin C4c P713E	pEGFP-C2	Kim 2006	EcoRI/ XhoI	GFP- <i>tag</i>	110,0 kDa
rGephyrin C4c F330A	pEGFP-C2	Kim 2006	EcoRI/ XhoI	GFP- <i>tag</i>	110,0 kDa
rGephyrin	pEGFP-N1	Meier 2000	HindIII/ NotI	GFP- <i>tag</i>	109,8 kDa
rGephyrin C3	pEGFP-N1	Meier 2000	HindIII/ NotI	GFP- <i>tag</i>	113,7 kDa
rGephyrin C4c	pEGFP-N1	Meier 2000	HindIII/ NotI	GFP- <i>tag</i>	111,3 kDa

5.3 Sequenzen

5.3.1 Gephyrinsequenz

Die Aminosäuresequenz von Gephyrin aus *Rattus norvegicus* (rGeph) setzt sich aus 736 Aminosäureresten zusammen und umfasst die G-, C- und E-Domäne. Die in dieser Arbeit untersuchten alternativen Spleißvarianten (rGeph, rGeph-C3, rGeph-C4c) sind innerhalb der Sequenz markiert und dargestellt.

→ GephG

MATEGMILTNHHDHQIRVGVLTVSDSCFRNLAEDRSGINLKDLVQDPSLLGGTISAYKIVPDEIE

EIKETLIDWCDEKELNLILTTGGTGFAPRDVTPEATKEVIEREAPGMALAMLMGSLNVTPLGM

LSRPVCGIRGKTLIINLPGSKKGSQECFQFILPALPHAIDLLRDAIVKVKEVHDELEDLPSPPPP

→ GephC

C3

LSPPPTTSPHKQTEDKGVQCEEEEEKKGDSGVASTEDSSSSHITAAALAAKIPDSIISRGVQV

C4c

LPRDTASLSTTPSESPRAQATSRLSTASCPTPKVQSRCSSKENILRASHSAVDITKVARRHR

→ GephE

MSPFPLTSMDFKAFITVLEMTPVLGTEIINYRDGMGRVLAQDVYAKDNLPPFPASVKDGYAVR

AADGPGDRFIIGESQAGEQPTQTVMPGQVMRVTTGAPIPCGADAVVQVEDTELIRESDDGT

EELEVRILVQARPGQDIRPIGHDIKRGECVLAKGTHMGPSEIGLLATVGVTEVEVNKFPVVAV

MSTGNELLNPEDDLLPGKIRDSNRSTLLATIQEHGYPTINLGIVGDNPDLLNALNEGISRAD

VIITSGGVSMGEKDYLKQVLDIDLHAQIHFGRVFMKPLPTTFATLDIDGVRKIIFALPGNPVS

AVVTCNLFVVPALRKMVGILDPRTIIRKARLSCDVKLDPRPEYHRCILTWHHQEPLPWAQST

GNQMSSRLMSMRSANGLLMLPPKTEQYVELHKGEVVDVMVIGRL

C3: NHPFYTSPAVFMANHGQPIPLISYSHHATGSADKR

C4c: ARLPSCSSTYSVSE

5.3.2 Sequenzen der GABA_AR-Untereinheiten

Die Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten GABA_AR-Untereinheiten und der GlyR- β -Untereinheit aus *Mus musculus* sind im Folgenden dargestellt. Markiert wurde das Sekretionssignal (ermittelt durch SignalP 4.0 Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) in grau, sowie der große zytoplasmatische Loop zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 (ermittelt durch <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) in rot.

GABA_AR- α 1:

MKKSRLSDYLWAWTLILSTLSGRSYGQPSQDELKDNTTVFTRILDRLLDGYDNRLRPGLG
 ERVTEVKTDIFVTSFGPVSDDHMEYIDVFFRQSWKDERLKFKGPMTVLRLNNLMASKIWTP
 DTFHNGKKSVAHNMTMPNKLLRITEDGTLTYMRLTVRAECPMHLEDFPMDAHACPLKFG
 SYAYTRAEVVYEWREPARSVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTHFHL
 KRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSFWLNRESVPARTVFGVTTVLTMTTLLSISARNSLPKVAYA
 TAMDWFIACVAFVFSALIEFATVNYFTKRGYAWDGKSVVPEKPKKVKDPLIKKNNTYAPTA
 TSYTPNLARGDPGLATIAKSATIEPKVKPETKPEPKKTFNSVSKIDRLSRIAFPLLFGIFNLV
 YWATYLNREPQLKAPTPHQ

GABA_AR- α 2:

MKTKLSTCNVWSLLLVLVWDPVRLVLANIQEDEAKNNITIFTRILDRLLDGYDNRLRPGLGD
 SITEVFTNIYVTSFGPVSDDHMEYIDVFFRQKWKDERLKFKGPMNILRLNNLMASKIWTPDT
 FFHNGKKSVAHNMTMPNKLLRIQDDGTLTYMRLTVQAECPMHLEDFPMDAHSCPLKFGS
 YAYTTSEVTYIWTYNASDSVQVAPDGSRLNQYDLLGQSIGKETIKSSTGEYTVMTAHFHLKR
 KIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSFWLNRESVPARTVFGVTTVLTMTTLLSISARNSLPKVAYATA
 MDWFIACVAFVFSALIEFATVNYFTKRGWAWDGKSVVNDKKKEKGSVMIQNNAYAVAVAN
 YAPNLSKDPVLSTISKSATTPEPNKKPENKPAEAKKTFNSVSKIDRMSRIVFPVLFGTFLVY
 WATYLNREPVLGVSP

GABA_AR- β 2:

MWRVRKRGYFGIWSFPLIAAVCAQSVNDPSNMSLVKETVDRLKGYDIRLRPDFGGPPVA
 VGMNIDIASIDMVSEVNMDYTLTMYFQQAWRDKRLSYNVIPLNLTLDNRVADQLWVPDITYFL
 NDKKSFVHGVTVKNRMIRLHPDGTVLYGLRITTTAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESGYTT
 DDIEFYWRGDDNAVTVTKIELPQFSIVDYKLITKVVVFSTGSPRLSLSFKLKRNIGYFILQT
 YMPSILITLSWVSFWINYDASAARVALGITTVLTMTTINTHLRETLPKIPYVKAIDMYLMGCFV
 FVMALLEYALVNYIFFGRGPRQKKA AEK AANANNEKMRLDVNKMDPHENILLSTLEIKNE

MATSEAVMGLGDPSTMLAYDASSIQYRKAGLPRHSFGRNALERHVAQKKSRLRRRASQL
KITIPDLTDVNAIDRWSRIFFPVVFSSFFNIVWLYYVN

GABA_AR-β3:

MWGFAGGRLFGIFSAPVLVAVVCCAQSVNDPGNMSFVKETVDKLLKGYDIRLRPDFGGPPV
CVGMNIDIASIDMVSEVNMDYTLTMYFQQYWRDKRLAYSGIPLNLTLDNRVADQLWVPDTPY
FLNDKKSFFVHGVTVKNRMIRLHPDGTVLYGLRITTTAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESYGY
TTDDIEFYWRGGDKAVTGVERIELPQFSIVEHRLVSRNVVFATGAYPRLSLSFRLKRNIGYFIL
QTYMPSILITLSWVSFWINYDASAARVALGITTTLTMTTINTHLRETLPKIPYVKAIDMYLMGC
FVFVFLALLEYAFVNYIFFGRGPQRQKLAEKTAKAKNDRSKSEINRVDHAHGNILLAPMDVH
NEMNEVAGSVGDTRNSAISFDNSGIQYRKQSMPKEGHGRYMGDRSIPHKKTHLRRRSSQL
KIKIPDLTDVNAIDRWSRIVFPFTFSLFNLVYWLYYVN

GABA_AR-γ2S:

MTLWILLLLSLYPGFTSQKSDDDYEDYASNKTWVLTTPKVPEGDVTILNNLLEGYDNKLRPDI
GVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQTWYDRRLKFNSTIKVLRLNSNMVGKIWIPD
TFFRNSKKADAHWITTPNRMLRIWINDGRVLYTLRLTIDAECQLQLHNFPMDEHSCPLEFSSY
GYPREEIVYQWKRSSVEVGDRSWRLYQFSFVGLRNTTEVVKTTSGDYVVMMSVYFDLSRR
MGYFTIQTYIPCTLIVVLSWVSFWINKDAVPARTSLGITTTLTMTTLSTIARKSLPKVSYVTAM
DLFVSVCFIVFSALVEYGLHYFVSNRKPSKDKDKKKKNPAPTIDIRPRSATIQMNNATHLQ
ERDEEYGYECLDGKDCASFFCCFEDCRTGAWRHGRIHIRIAKMDSYARIFFPTAFCLFNLVY
WVSYLYL

GABA_AR-γ2L:

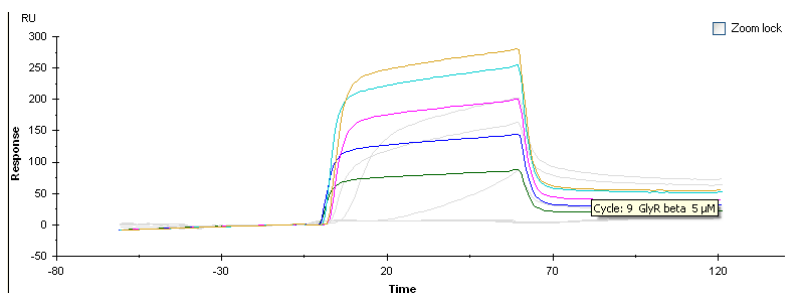
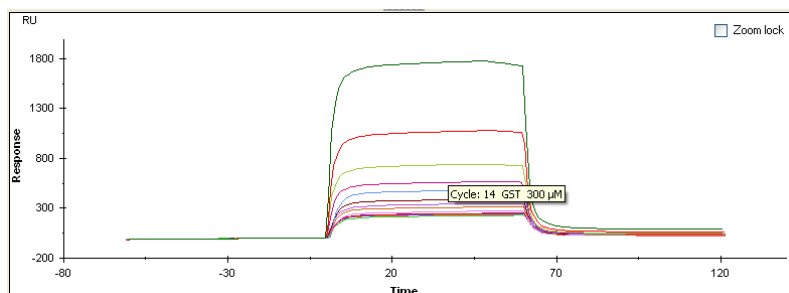
MSSPNTWSIGSSVYSPVFSQKMTLWILLLLSLYPGFTSQKSDDDYEDYASNKTWVLTTPKVP
EGDVTILNNLLEGYDNKLRPDIGVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQTWYDRRL
KFNSTIKVLRLNSNMVGKIWIPDTFFRNSKKADAHWITTPNRMLRIWINDGRVLYTLRLTIDAE
CQLQLHNFPMDEHSCPLEFSSYGYPREEIVYQWKRSSVEVGDRSWRLYQFSFVGLRNTT
EVVKTTSYDYVVMMSVYFDLSRRMGYFTIQTYIPCTLIVVLSWVSFWINKDAVPARTSLGITT
LTMTTLSTIARKSLPKVSYVTAMD L F V S V C F I V F S A L V E Y G L H Y F V S N R K P S K D K D K K K N
P L L R M F S F K A P T I D I R P R S A T I Q M N N A T H L Q E R D E E Y G Y E C L D G K D C A S F F C C F E D C R T G A
W R H G R I H I R I A K M D S Y A R I F F P T A F C L F N L V Y W V S Y L Y L

GlyR- β :

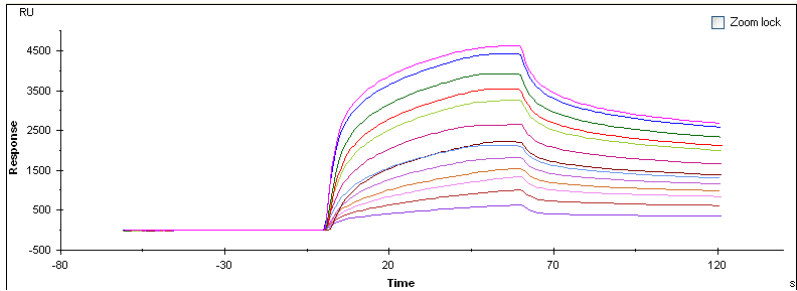
MKFSLAISFFILMSLLFEDACAKEKSSKKGKGGKKKQYLCPSQQSPEDLARVPPNSTSNILNRL
 LVSYDPRIRPNFKGIPVDVVNIFINSFGSIQETTMDYRVNIFLRQKWNDPRLKLPSEDFRGS
 ALTVDPTMYKCLWKPDFFANEKSANFHDTVQENILLFIFRDGDVLSMRLSITLSCPLDLTL
 FPMDTQRCKMQLESFGYTTDDLRFIWQSGDPVQLEKIALPQFDIKKEDIEYGNCTKYYKGTG
 YYTCVEVIFTLRRQVGFYMMGVYAPTLLIVVLSWLSFWINPDASAARVPLGIFSVLSLASECT
 TLAELPKVSYVKALDVWLIACLLFGFASLVEYAVVQVMLNPNKRVEAEKARIAKAEQADGK
 GGNAAKKNTVNGTGTPVHISTLQVGETRCKKVCTSKSDLRSNDFSIVGS�PRDFELSNYDC
 YGKPIEVNNGLGKPKAKNKKPPPAKPVIPATAKRIDLARALFPFCFLFFNVIYWSIYL

5.4 Original SPR-Kurven

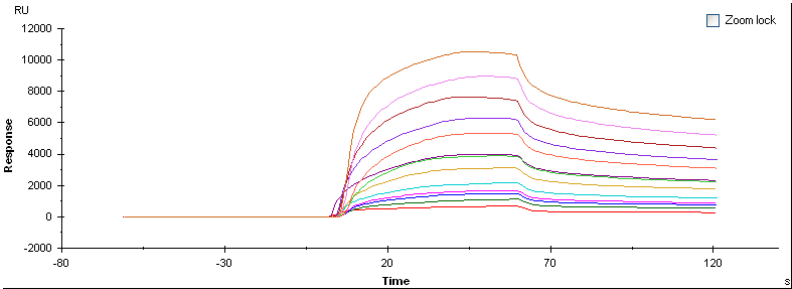
Die Rohdaten der SPR-Messungen sind im Folgenden dargestellt. Es ist jeweils eine Einzelmessung über ein Konzentrationsspektrum für die verschiedenen Proteine dargestellt. Die gereinigten GST-fusionierten Rezeptor-Loops sowie das GST wurden für die Messungen mit kovalent an einen CM5-Sensorchip gekoppeltem Gephyrin eingesetzt. Das gereinigte Gephyrin wurde dagegen für Analysen mit einem biotinylierten GABA_AR- β ₂₃₉₀₋₄₂₀-Peptid verwendet.

GST-GlyR- β -LoopGST

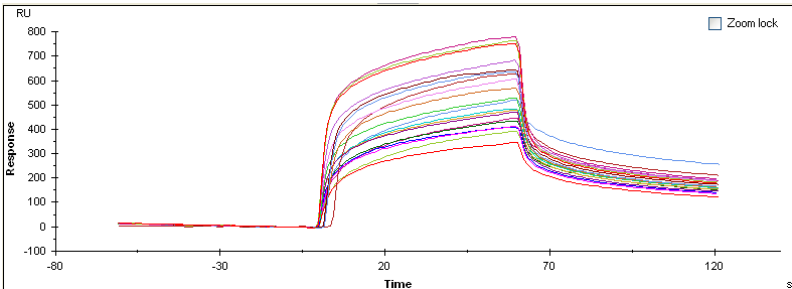
GST-GABA_AR-β₂₃₀₆₋₄₃₀-Loop



GST-GABA_AR-β₂₃₉₀₋₄₂₀-Loop



Gephyrin



6 Literaturverzeichnis

Altschuler, R. A., Betz, H., Parakkal, M. H., Reeks, K. A., and Wenthold, R. J. (1986). Identification of glycinergic synapses in the cochlear nucleus through immunocytochemical localization of the postsynaptic receptor. *Brain Res* 369, 316-320.

Alvarez, F. J., Dewey, D. E., Harrington, D. A., and Fyffe, R. E. (1997). Cell-type specific organization of glycine receptor clusters in the mammalian spinal cord. *J Comp Neurol* 379, 150-170.

Arancibia-Carcamo, I. L., Yuen, E. Y., Muir, J., Lumb, M. J., Michels, G., Saliba, R. S., Smart, T. G., Yan, Z., Kittler, J. T., and Moss, S. J. (2009). Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17552-17557.

Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N., and Langer, S. Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50, 291-313.

Barnes, E. M., Jr. (1996). Use-dependent regulation of GABAA receptors. *Int Rev Neurobiol* 39, 53-76.

Barresi, R., and Campbell, K. P. (2006). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* 119, 199-207.

Baumann, S. W., Baur, R., and Sigel, E. (2001). Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 276, 36275-36280.

Baumann, S. W., Baur, R., and Sigel, E. (2002). Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem* 277, 46020-46025.

Baur, R., Minier, F., and Sigel, E. (2006). A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett* 580, 1616-1620.

Bausen, M., Weltzien, F., Betz, H., and O'Sullivan, G. A. (2010). Regulation of postsynaptic gephyrin cluster size by protein phosphatase 1. *Mol Cell Neurosci* 44, 201-209.

Bedford, F. K., Kittler, J. T., Muller, E., Thomas, P., Uren, J. M., Merlo, D., Wisden, W., Triller, A., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2001). GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci* 4, 908-916.

Benarroch, E. E. (2007). GABAA receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology* 68, 612-614.

Betz, H., and Laube, B. (2006). Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 97, 1600-1610.

Bogdanov, Y., Michels, G., Armstrong-Gold, C., Haydon, P. G., Lindstrom, J., Pangalos, M., and Moss, S. J. (2006). Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *Embo J* 25, 4381-4389.

Bormann, J., and Feigenspan, A. (1995). GABAC receptors. *Trends Neurosci* 18, 515-519.

Bormann, J., Rundstrom, N., Betz, H., and Langosch, D. (1993). Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *Embo J* 12, 3729-3737.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brandon, N. J., Delmas, P., Kittler, J. T., McDonald, B. J., Sieghart, W., Brown, D. A., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2000). GABAA receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 275, 38856-38862.

Brandon, N. J., Jovanovic, J. N., Colledge, M., Kittler, J. T., Brandon, J. M., Scott, J. D., and Moss, S. J. (2003). A-kinase anchoring protein 79/150 facilitates the phosphorylation of GABA(A) receptors by cAMP-dependent protein kinase via selective interaction with receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci* 22, 87-97.

Brandon, N. J., and Moss, S. J. (2000). Receptor cross talk: ligand-gated ion channels start to communicate. *Sci STKE* 2000, pe1.

Brejck, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B., and Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269-276.

Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G., and Farrant, M. (1999). Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J Neurosci* 19, 2960-2973.

Bridgman, P. C. (2004). Myosin-dependent transport in neurons. *J Neurobiol* 58, 164-174.

Buller, A. L., Hastings, G. A., Kirkness, E. F., and Fraser, C. M. (1994). Site-directed mutagenesis of N-linked glycosylation sites on the gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 1 subunit. *Mol Pharmacol* 46, 858-865.

Burt, D. R., and Kamatchi, G. L. (1991). GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *Faseb J* 5, 2916-2923.

Cai, C., Li, H., Rivera, C., and Keinänen, K. (2006). Interaction between SAP97 and PSD-95, two Maguk proteins involved in synaptic trafficking of AMPA receptors. *J Biol Chem* 281, 4267-4273.

Cajigas, I. J., Will, T., and Schuman, E. M. (2010). Protein homeostasis and synaptic plasticity. *Embo J* 29, 2746-2752.

Calamai, M., Specht, C. G., Heller, J., Alcor, D., Machado, P., Vannier, C., and Triller, A. (2009). Gephyrin oligomerization controls GlyR mobility and synaptic clustering. *J Neurosci* 29, 7639-7648.

Campbell, N. A. (2000). *Biologie*, Vol 2. deutsche Ausgabe (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).

Charych, E. I., Liu, F., Moss, S. J., and Brandon, N. J. (2009). GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders. *Neuropharmacology* 57, 481-495.

Charych, E. I., Yu, W., Miralles, C. P., Serwanski, D. R., Li, X., Rubio, M., and De Blas, A. L. (2004). The brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2, a protein involved in vesicular trafficking, interacts with the beta subunits of the GABA receptors. *J Neurochem* 90, 173-189.

Christie, S. B., and de Blas, A. L. (2002). alpha5 Subunit-containing GABA(A) receptors form clusters at GABAergic synapses in hippocampal cultures. *Neuroreport* 13, 2355-2358.

Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X., and Huganir, R. L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci* 20, 7258-7267.

Collins, M. O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J. M., Anderson, C. N., Blackstock, W. P., Choudhary, J. S., and Grant, S. G. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem* 97 *Suppl 1*, 16-23.

Connolly, C. N., Krishek, B. J., McDonald, B. J., Smart, T. G., and Moss, S. J. (1996). Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 271, 89-96.

Connolly, C. N., and Wafford, K. A. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32, 529-534.

Corringer, P. J., Le Novère, N., and Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 431-458.

Couve, A., Moss, S. J., and Pangalos, M. N. (2000). GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* 16, 296-312.

Craddock, N., Jones, L., Jones, I. R., Kirov, G., Green, E. K., Grozeva, D., Moskvina, V., Nikolov, I., Hamshere, M. L., Vukcevic, D., *et al.* (2010). Strong genetic evidence for a selective influence of GABAA receptors on a component of the bipolar disorder phenotype. *Mol Psychiatry* 15, 146-153.

Crestani, F., Lorez, M., Baer, K., Essrich, C., Benke, D., Laurent, J. P., Belzung, C., Fritschy, J. M., Luscher, B., and Mohler, H. (1999). Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci* 2, 833-839.

Danglot, L., Triller, A., and Bessis, A. (2003). Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 23, 264-278.

Diviani, D., Lattion, A. L., Abuin, L., Staub, O., and Cotecchia, S. (2003). The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem* 278, 19331-19340.

Dobie, F. A., and Craig, A. M. (2011). Inhibitory synapse dynamics: coordinated presynaptic and postsynaptic mobility and the major contribution of recycled vesicles to new synapse formation. *J Neurosci* 31, 10481-10493.

Dumoulin, A., Levi, S., Riveau, B., Gasnier, B., and Triller, A. (2000). Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur J Neurosci* 12, 3883-3892.

Dumoulin, A., Rostaing, P., Bedet, C., Levi, S., Isambert, M. F., Henry, J. P., Triller, A., and Gasnier, B. (1999). Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 112 (Pt 6), 811-823.

Ehrensperger, M. V., Hanus, C., Vannier, C., Triller, A., and Dahan, M. (2007). Multiple association states between glycine receptors and gephyrin identified by SPT analysis. *Biophys J* 92, 3706-3718.

Ehya, N., Sarto, I., Wabnegger, L., and Sieghart, W. (2003). Identification of an amino acid sequence within GABA(A) receptor beta3 subunits that is important for receptor assembly. *J Neurochem* 84, 127-135.

Engelender, S., Sharp, A. H., Colomer, V., Tokito, M. K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaur, E. L., and Ross, C. A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet* 6, 2205-2212.

Eroglu, C., and Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223-231.

Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J. M., and Luscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1, 563-571.

Farrant, M., and Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6, 215-229.

Fellin, T. (2009). Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem* 108, 533-544.

Feng, G., TINTRUP, H., KIRSCH, J., NICHOL, M. C., KUHSE, J., BETZ, H., and SANES, J. R. (1998). Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* 282, 1321-1324.

Finkel, T., Theriot, J. A., DISE, K. R., TOMASELLI, G. F., and GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. (1994). Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1510-1514.

Friauf, E., Hammerschmidt, B., and Kirsch, J. (1997). Development of adult-type inhibitory glycine receptors in the central auditory system of rats. *J Comp Neurol* 385, 117-134.

Fritschy, J. M. (2008). Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity. *Front Mol Neurosci* 1, 5.

Fritschy, J. M., Harvey, R. J., and Schwarz, G. (2008). Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci* 31, 257-264.

Fritschy, J. M., and Mohler, H. (1995). GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 359, 154-194.

Fritschy, J. M., Panzanelli, P., and Tyagarajan, S. K. (2012). Molecular and functional heterogeneity of GABAergic synapses. *Cell Mol Life Sci*.

Fuhrmann, J. C., Kins, S., Rostaing, P., El Far, O., Kirsch, J., Sheng, M., Triller, A., Betz, H., and Kneussel, M. (2002). Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci* 22, 5393-5402.

Fujii, M., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Moss, S.J., Nabekura, J. and Hirata, M. (2010). Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* 285, 4837-4846.

Gallagher, M. J., Ding, L., Maheshwari, A., and Macdonald, R. L. (2007). The GABAA receptor alpha1 subunit epilepsy mutation A322D inhibits transmembrane helix formation and causes proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12999-13004.

Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelieres, F. P., De Mey, J., MacDonald, M. E., Lessmann, V., Humbert, S., and Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127-138.

Giesemann, T., Schwarz, G., Nawrotzki, R., Berhorster, K., Rothkegel, M., Schluter, K., Schrader, N., Schindelin, H., Mendel, R. R., Kirsch, J., and Jockusch, B. M. (2003). Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci* 23, 8330-8339.

Glykys, J., and Mody, I. (2007). Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* 56, 763-770.

Goto, H., Terunuma, M., Kanematsu, T., Misumi, Y., Moss, S. J., and Hirata, M. (2005). Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA(A) receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci* 30, 197-206.

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

Gray, E. G. (1969). Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review. *Prog Brain Res* 31, 141-155.

Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., and Laube, B. (2005). The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45, 727-739.

Gunther, U., Benson, J., Benke, D., Fritschy, J. M., Reyes, G., Knoflach, F., Crestani, F., Aguzzi, A., Arigoni, M., Lang, Y., and et al. (1995). Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7749-7753.

Haenggi, T., and Fritschy, J. M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol Life Sci* 63, 1614-1631.

Hales, T. G., Tang, H., Bolland, K. A., Johnson, S. J., King, D. P., McDonald, N. A., Cheng, A., and Connolly, C. N. (2005). The epilepsy mutation, gamma2(R43Q) disrupts a highly conserved inter-subunit contact site, perturbing the biogenesis of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci* 29, 120-127.

Hanus, C., Vannier, C., and Triller, A. (2004). Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J Neurosci* 24, 1119-1128.

Haucke, V., Wenk, M. R., Chapman, E. R., Farsad, K., and De Camilli, P. (2000). Dual interaction of synaptotagmin with mu2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation. *Embo J* 19, 6011-6019.

Heisler, F. F., Loebrich, S., Pechmann, Y., Maier, N., Zivkovic, A. R., Tokito, M., Hausrat, T. J., Schweizer, M., Bähring, R., Holzbaur, E. L., et al. (2011). Muskelnin regulates actin filament- and microtubule-based GABA(A) receptor transport in neurons. *Neuron* 70, 66-81.

Herring, D., Huang, R., Singh, M., Robinson, L. C., Dillon, G. H., and Leidenheimer, N. J. (2003). Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor. *J Biol Chem* 278, 24046-24052.

Herweg, J. (2012) Biochemische Charakterisierung von Gephyrin: Oligomerisierung, posttranslationale Modifikationen und Glycin-Rezeptor Interaktion, Universität zu Köln, Köln.

Herweg, J., and Schwarz, G. (2012). Splice-specific glycine receptor binding, folding, and phosphorylation of the scaffolding protein gephyrin. *J Biol Chem* 287, 12645-12656.

Hilf, R. J., and Dutzler, R. (2008). X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452, 375-379.

Hirokawa, N., and Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6, 201-214.

Ichtchenko, K., Nguyen, T., and Sudhof, T. C. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem* 271, 2676-2682.

Jacob, T. C., Moss, S. J., and Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9, 331-343.

Jemth, P., and Gianni, S. (2007). PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry* 46, 8701-8708.

Jensen, K., Chiu, C. S., Sokolova, I., Lester, H. A., and Mody, I. (2003). GABA transporter-1 (GAT1)-deficient mice: differential tonic activation of GABAA versus GABAB receptors in the hippocampus. *J Neurophysiol* 90, 2690-2701.

Jurd, R., Tretter, V., Walker, J., Brandon, N. J., and Moss, S. J. (2010). Fyn kinase contributes to tyrosine phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Mol Cell Neurosci* 44, 129-134.

Kanematsu, T., and Hirata, M. (2002). [The analysis of protein-protein interaction with special reference to PRIP-1]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 119, 241-246.

Kanematsu, T., Yasunaga, A., Mizoguchi, Y., Kuratani, A., Kittler, J. T., Jovanovic, J. N., Takenaka, K., Nakayama, K. I., Fukami, K., Takenawa, T., *et al.* (2006). Modulation of GABA(A) receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition. *J Biol Chem* 281, 22180-22189.

Kastning, K., Kukhtina, V., Kittler, J. T., Chen, G., Pechstein, A., Enders, S., Lee, S. H., Sheng, M., Yan, Z., and Haucke, V. (2007). Molecular determinants for the interaction between AMPA receptors and the clathrin adaptor complex AP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2991-2996.

Ke, Y., Cohen, B. M., Bang, J. Y., Yang, M., and Renshaw, P. F. (2000). Assessment of GABA concentration in human brain using two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Res* 100, 169-178.

Keller, C. A., Yuan, X., Panzanelli, P., Martin, M. L., Alldred, M., Sassoe-Pognetto, M., and Luscher, B. (2004). The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci* 24, 5881-5891.

Kim, E. Y., Schrader, N., Smolinsky, B., Bedet, C., Vannier, C., Schwarz, G., and Schindelin, H. (2006). Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *Embo J* 25, 1385-1395.

Kins, S., Betz, H., and Kirsch, J. (2000). Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci* 3, 22-29.

Kirsch, J., and Betz, H. (1995). The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci* 15, 4148-4156.

Kirsch, J., Kuhse, J., and Betz, H. (1995). Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Cell Neurosci* 6, 450-461.

Kirsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U. Z., Schmitt, B., and Betz, H. (1991). The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem* 266, 22242-22245.

Kirsch, J., Wolters, I., Triller, A., and Betz, H. (1993). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366, 745-748.

Kittler, J. T., Chen, G., Honing, S., Bogdanov, Y., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I. L., Jovanovic, J. N., Pangalos, M. N., Haucke, V., Yan, Z., and Moss, S. J. (2005). Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14871-14876.

Kittler, J. T., Chen, G., Kukhtina, V., Vahedi-Faridi, A., Gu, Z., Tretter, V., Smith, K. R., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I. L., Saenger, W., *et al.* (2008). Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3616-3621.

Kittler, J. T., McAinsh, K., and Moss, S. J. (2002). Mechanisms of GABAA receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol* 26, 251-268.

Kittler, J. T., Rostaing, P., Schiavo, G., Fritschy, J. M., Olsen, R., Triller, A., and Moss, S. J. (2001). The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* 18, 13-25.

Kittler, J. T., Thomas, P., Tretter, V., Bogdanov, Y. D., Haucke, V., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2004). Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12736-12741.

Kneussel, M., and Betz, H. (2000). Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol* 525 Pt 1, 1-9.

Kneussel, M., Brandstatter, J. H., Gasnier, B., Feng, G., Sanes, J. R., and Betz, H. (2001). Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* 17, 973-982.

Kneussel, M., Brandstatter, J. H., Laube, B., Stahl, S., Muller, U., and Betz, H. (1999). Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19, 9289-9297.

Kneussel, M., Haverkamp, S., Fuhrmann, J. C., Wang, H., Wassle, H., Olsen, R. W., and Betz, H. (2000). The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8594-8599.

Kneussel, M., Hermann, A., Kirsch, J., and Betz, H. (1999). Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta-subunit to gephyrin. *J Neurochem* 72, 1323-1326.

Knight, D., Harris, R., McAlister, M. S., Phelan, J. P., Geddes, S., Moss, S. J., Driscoll, P. C., and Keep, N. H. (2002). The X-ray crystal structure and putative ligand-derived peptide binding properties of gamma-aminobutyric acid receptor type A receptor-associated protein. *J Biol Chem* 277, 5556-5561.

Knuesel, I., Mastrocola, M., Zuellig, R. A., Bornhauser, B., Schaub, M. C., and Fritschy, J. M. (1999). Short communication: altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur J Neurosci* 11, 4457-4462.

Kowalczyk, S., Winkelmann, A., Smolinsky, B., Förster, B., Schwarz, G., and Meier, J. C. (unveröffentlichte Daten). A novel phosphorylation-dependent interaction of gephyrin with the GABAA receptor beta2 and beta3 subunits.

Kuhse, J., Kalbouneh, H., Schlicksupp, A., Muekusch, S., Nawrotzki, R., and Kirsch, J. (2012). Phosphorylation of gephyrin in hippocampal neurons by cyclin-dependent kinase CDK5 at S270 is dependent on collybistin. *J Biol Chem*.

Kuhse, J., Laube, B., Magalei, D., and Betz, H. (1993). Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11, 1049-1056.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Langosch, D., Hoch, W., and Betz, H. (1992). The 93 kDa protein gephyrin and tubulin associated with the inhibitory glycine receptor are phosphorylated by an endogenous protein kinase. *FEBS Lett* 298, 113-117.

Lardi-Studler, B., Smolinsky, B., Petitjean, C. M., Koenig, F., Sidler, C., Meier, J. C., Fritschy, J. M., and Schwarz, G. (2007). Vertebrate-specific sequences in the gephyrin E-domain regulate cytosolic aggregation and postsynaptic clustering. *J Cell Sci* 120, 1371-1382.

Laube, B., Kuhse, J., and Betz, H. (2000). Kinetic and mutational analysis of Zn²⁺ modulation of recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol* 522 Pt 2, 215-230.

Lee, S. H., Liu, L., Wang, Y. T., and Sheng, M. (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36, 661-674.

Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58, 760-793.

Leil, T. A., Chen, Z. W., Chang, C. S., and Olsen, R. W. (2004). GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* 24, 11429-11438.

Leite, J. F., and Cascio, M. (2001). Structure of ligand-gated ion channels: critical assessment of biochemical data supports novel topology. *Mol Cell Neurosci* 17, 777-792.

Levi, S., Schweizer, C., Bannai, H., Pascual, O., Charrier, C., and Triller, A. (2008). Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. *Neuron* 59, 261-273.

Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H., and Ross, C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402.

Lo, W. Y., Lagrange, A. H., Hernandez, C. C., Harrison, R., Dell, A., Haslam, S. M., Sheehan, J. H., and Macdonald, R. L. (2010). Glycosylation of β 2 subunits regulates GABAA receptor biogenesis and channel gating. *J Biol Chem* 285, 31348-31361.

Loebrich, S., Bähring, R., Katsuno, T., Tsukita, S., and Kneussel, M. (2006). Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *Embo J* 25, 987-999.

Lopez-Corcuera, B., Geerlings, A., and Aragon, C. (2001). Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Mol Membr Biol* 18, 13-20.

Lu, Y. F., Kojima, N., Tomizawa, K., Moriwaki, A., Matsushita, M., Obata, K., and Matsui, H. (1999). Enhanced synaptic transmission and reduced threshold for LTP induction in fyn-transgenic mice. *Eur J Neurosci* 11, 75-82.

Luscher, B., Fuchs, T., and Kilpatrick, C. L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70, 385-409.

Lydiard, R. B. (2003). The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 3, 21-27.

Maas, C., Belgardt, D., Lee, H. K., Heisler, F. F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M. M., van Dijk, J., Hausrat, T. J., Janke, C., and Kneussel, M. (2009). Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8731-8736.

Maas, C., Tagnaouti, N., Loebrich, S., Behrend, B., Lappe-Siefke, C., and Kneussel, M. (2006). Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol* 172, 441-451.

Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T., and Takai, Y. (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 86-89.

Man, H. Y., Lin, J. W., Ju, W. H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L. E., Sheng, M., and Wang, Y. T. (2000). Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25, 649-662.

Maric, H. M., Mukherjee, J., Tretter, V., Moss, S. J., and Schindelin, H. (2011). Gephyrin-mediated gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor clustering relies on a common binding site. *J Biol Chem* 286, 42105-42114.

Matsuda, S., Mikawa, S., and Hirai, H. (1999). Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *J Neurochem* 73, 1765-1768.

McDonald, B. J., Amato, A., Connolly, C. N., Benke, D., Moss, S. J., and Smart, T. G. (1998). Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* 1, 23-28.

McDonald, B. J., and Moss, S. J. (1994). Differential phosphorylation of intracellular domains of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269, 18111-18117.

McKinley, D. D., Lennon, D. J., and Carter, D. B. (1995). Cloning, sequence analysis and expression of two forms of mRNA coding for the human beta 2 subunit of the GABAA receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 28, 175-179.

Meier, J., De Chaldee, M., Triller, A., and Vannier, C. (2000). Functional heterogeneity of gephyrins. *Mol Cell Neurosci* 16, 566-577.

Meier, J., and Grantyn, R. (2004). Preferential accumulation of GABAA receptor gamma 2L, not gamma 2S, cytoplasmic loops at rat spinal cord inhibitory synapses. *J Physiol* 559, 355-365.

Meier, J., Vannier, C., Serge, A., Triller, A., and Choquet, D. (2001). Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 4, 253-260.

Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., and Langosch, D. (1995). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15, 563-572.

Michels, G., and Moss, S. J. (2007). GABAA receptors: properties and trafficking. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42, 3-14.

Mishina, M., Tobimatsu, T., Imoto, K., Tanaka, K., Fujita, Y., Fukuda, K., Kurasaki, M., Takahashi, H., Morimoto, Y., Hirose, T., and et al. (1985). Location of functional regions of acetylcholine receptor alpha-subunit by site-directed mutagenesis. *Nature* 313, 364-369.

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., and Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-955.

Morgan, A., and Burgoyne, R. D. (2004). Membrane traffic: controlling membrane fusion by modifying NSF. *Curr Biol* 14, R968-970.

Moss, S. J., Gorrie, G. H., Amato, A., and Smart, T. G. (1995). Modulation of GABAA receptors by tyrosine phosphorylation. *Nature* 377, 344-348.

Moss, S. J., and Smart, T. G. (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2, 240-250.

Muir, J., Arancibia-Carcamo, I. L., MacAskill, A. F., Smith, K. R., Griffin, L. D., and Kittler, J. T. (2010). NMDA receptors regulate GABAA receptor lateral mobility and clustering at inhibitory synapses through serine 327 on the gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16679-16684.

Mukherjee, J., Kretschmannova, K., Gouzer, G., Maric, H. M., Ramsden, S., Tretter, V., Harvey, K., Davies, P. A., Triller, A., Schindelin, H., and Moss, S. J. (2011). The residence time of GABA(A)Rs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor alpha1 subunit to gephyrin. *J Neurosci* 31, 14677-14687.

Nawrotzki, R., Islinger, M., Vogel, I., Volkl, A., and Kirsch, J. (2012). Expression and subcellular distribution of gephyrin in non-neuronal tissues and cells. *Histochem Cell Biol* 137, 471-482.

Neurowissenschaftliche-Gesellschaft (2012). http://dasgehirn.info/entdecken/kommunikation-der-zellen/aufbau-eines-neurons-2907/image_mediathek_large

(Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. - Max-Dellbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin).

Niwa, F., Bannai, H., Arizono, M., Fukatsu, K., Triller, A., and Mikoshiba, K. (2012). Gephyrin-independent GABA(A)R mobility and clustering during plasticity. *PLoS One* 7, e36148.

Nusser, Z., Cull-Candy, S., and Farrant, M. (1997). Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19, 697-709.

Nymann-Andersen, J., Sawyer, G. W., and Olsen, R. W. (2002). Interaction between GABAA receptor subunit intracellular loops: implications for higher order complex formation. *J Neurochem* 83, 1164-1171.

Olsen, R. W., and Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60, 243-260.

Otis, T. S., De Koninck, Y., and Mody, I. (1994). Lasting potentiation of inhibition is associated with an increased number of gamma-aminobutyric acid type A receptors activated during miniature inhibitory postsynaptic currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7698-7702.

Paarmann, I., Saiyed, T., Schmitt, B., and Betz, H. (2006). Gephyrin: does splicing affect its function? *Biochem Soc Trans* 34, 45-47.

Paarmann, I., Schmitt, B., Meyer, B., Karas, M., and Betz, H. (2006). Mass spectrometric analysis of glycine receptor-associated gephyrin splice variants. *J Biol Chem* 281, 34918-34925.

Panzanelli, P., Gunn, B. G., Schlatter, M. C., Benke, D., Tyagarajan, S. K., Scheiffele, P., Belelli, D., Lambert, J. J., Rudolph, U., and Fritschy, J. M. (2011). Distinct mechanisms regulate GABAA receptor and gephyrin clustering at perisomatic and axo-axonic synapses on CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 589, 4959-4980.

Papadopoulos, T., Korte, M., Eulenburg, V., Kubota, H., Retiounskaia, M., Harvey, R. J., Harvey, K., O'Sullivan, G. A., Laube, B., Hulsmann, S., *et al.* (2007). Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *Embo J* 26, 3888-3899.

Papadopoulos, T., and Soykan, T. (2011). The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: facts and open questions. *Front Cell Neurosci* 5, 11.

Parker, M. W., Lo Bello, M., and Federici, G. (1990). Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. *J Mol Biol* 213, 221-222.

Perrais, D., and Ropert, N. (1999). Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABAA receptors in central synapses. *J Neurosci* 19, 578-588.

Pfeiffer, F., Graham, D., and Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257, 9389-9393.

Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., and Sperk, G. (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815-850.

Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., *et al.* (2009). Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63, 628-642.

Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J., and *et al.* (1992). Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8, 1161-1170.

Ramming, M., Kins, S., Werner, N., Hermann, A., Betz, H., and Kirsch, J. (2000). Diversity and phylogeny of gephyrin: tissue-specific splice variants, gene structure, and sequence similarities to molybdenum cofactor-synthesizing and cytoskeleton-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10266-10271.

Reddy-Alla, S., Schmitt, B., Birkenfeld, J., Eulenburg, V., Dutertre, S., Bohringer, C., Gotz, M., Betz, H., and Papadopoulos, T. (2010). PH-domain-driven targeting of collybistin but not Cdc42 activation is required for synaptic gephyrin clustering. *Eur J Neurosci* 31, 1173-1184.

Reid, T., Bathorn, A., Ahmadian, M. R., and Collard, J. G. (1999). Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *J Biol Chem* 274, 33587-33593.

Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J., Boeckeler, K., and Parker, P. J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 103-112.

Rudolph, U., and Mohler, H. (2004). Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 475-498.

Sabatini, D. M., Barrow, R. K., Blackshaw, S., Burnett, P. E., Lai, M. M., Field, M. E., Bahr, B. A., Kirsch, J., Betz, H., and Snyder, S. H. (1999). Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284, 1161-1164.

Saiepour, L., Fuchs, C., Patrizi, A., Sassoe-Pognetto, M., Harvey, R. J., and Harvey, K. (2010). Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering. *J Biol Chem* 285, 29623-29631.

Saliba, R. S., Michels, G., Jacob, T. C., Pangalos, M. N., and Moss, S. J. (2007). Activity-dependent ubiquitination of GABA(A) receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *J Neurosci* 27, 13341-13351.

Sarto-Jackson, I., Milenkovic, I., Smalla, K. H., Gundelfinger, E. D., Kaehne, T., Herrera-Molina, R., Thomas, S., Kiebler, M. A., and Sieghart, W. (2012). The cell adhesion molecule neuroligin-1 is a novel interaction partner of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 287, 14201-14214.

Sarto-Jackson, I., Ramerstorfer, J., Ernst, M., and Sieghart, W. (2006). Identification of amino acid residues important for assembly of GABA receptor alpha1 and gamma2 subunits. *J Neurochem* 96, 983-995.

Sassoe-Pognetto, M., Kirsch, J., Grunert, U., Greferath, U., Fritschy, J. M., Mohler, H., Betz, H., and Wässle, H. (1995). Colocalization of gephyrin and GABA(A)-receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 357, 1-14.

Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Sieghart, W., and Fritschy, J. M. (2000). Colocalization of multiple GABA(A) receptor subtypes with gephyrin at postsynaptic sites. *J Comp Neurol* 420, 481-498.

Saxena, N. C., and Macdonald, R. L. (1996). Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol Pharmacol* 49, 567-579.

Schluter, K., Jockusch, B. M., and Rothkegel, M. (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1359, 97-109.

Schrader, N., Kim, E. Y., Winking, J., Paulukat, J., Schindelin, H., and Schwarz, G. (2004). Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *J Biol Chem* 279, 18733-18741.

Schwarz, G. (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci* 62, 2792-2810.

Schwarz, G., Schrader, N., Mendel, R. R., Hecht, H. J., and Schindelin, H. (2001). Crystal structures of human gephyrin and plant Cnx1 G domains: comparative analysis and functional implications. *J Mol Biol* 312, 405-418.

Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24, 1-29.

Shepherd, J. D., and Huganir, R. L. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 613-643.

Shin, H. W., Morinaga, N., Noda, M., and Nakayama, K. (2004). BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Mol Biol Cell* 15, 5283-5294.

Sigel, E., Kaur, K. H., Luscher, B. P., and Baur, R. (2009). Use of concatamers to study GABAA receptor architecture and function: application to delta-subunit-containing receptors and possible pitfalls. *Biochem Soc Trans* 37, 1338-1342.

Smith, K. R., McAinsh, K., Chen, G., Arancibia-Carcamo, I. L., Haucke, V., Yan, Z., Moss, S. J., and Kittler, J. T. (2008). Regulation of inhibitory synaptic transmission by a conserved atypical interaction of GABA(A) receptor beta- and gamma-subunits with the clathrin AP2 adaptor. *Neuropharmacology* 55, 844-850.

Smith, K. R., Muir, J., Rao, Y., Browarski, M., Gruenig, M. C., Sheehan, D. F., Haucke, V., and Kittler, J. T. (2012). Stabilization of GABA(A) receptors at endocytic zones is mediated by an AP2 binding motif within the GABA(A) receptor beta3 subunit. *J Neurosci* 32, 2485-2498.

Smolinsky, B. (2009) Duale Funktion von Gephyrin: Clustern von inhibitorischen Neurorezeptoren und Molybdäncofaktor-Synthese, Universität zu Köln, Köln.

Smolinsky, B. (2009) Duale Funktion von Gephyrin: Clustern von inhibitorischen Neurorezeptoren und Molybdäncofaktor-Synthese, Universität zu Köln, Köln.

Smolinsky, B., Eichler, S. A., Buchmeier, S., Meier, J. C., and Schwarz, G. (2008). Splice-specific functions of gephyrin in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem*.

Soghomonian, J. J., and Martin, D. L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19, 500-505.

Sola, M., Bavro, V. N., Timmins, J., Franz, T., Ricard-Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok, R. W., Paarmann, I., Saiyed, T., O'Sullivan, G. A., *et al.* (2004). Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *Embo J* 23, 2510-2519.

Sontheimer, H., Becker, C. M., Pritchett, D. B., Schofield, P. R., Grenningloh, G., Kettenmann, H., Betz, H., and Seeburg, P. H. (1989). Functional chloride channels by mammalian cell expression of rat glycine receptor subunit. *Neuron* 2, 1491-1497.

Specht, C. G., Grunewald, N., Pascual, O., Rostgaard, N., Schwarz, G., and Triller, A. (2011). Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *Embo J* 30, 3842-3853.

Specht, C. G., and Triller, A. (2008). The dynamics of synaptic scaffolds. *Bioessays* 30, 1062-1074.

Stallmeyer, B., Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H., and Mendel, R. R. (1995). Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *Plant J* 8, 751-762.

Strange, P. G. (1988). The structure and mechanism of neurotransmitter receptors. Implications for the structure and function of the central nervous system. *Biochem J* 249, 309-318.

Tanaka, M., Olsen, R. W., Medina, M. T., Schwartz, E., Alonso, M. E., Duron, R. M., Castro-Ortega, R., Martinez-Juarez, I. E., Pascual-Castroviejo, I., Machado-Salas, J., *et al.* (2008). Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet* 82, 1249-1261.

Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B., and Choquet, D. (2003). Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *Embo J* 22, 4656-4665.

Taylor, P. M., Thomas, P., Gorrie, G. H., Connolly, C. N., Smart, T. G., and Moss, S. J. (1999). Identification of amino acid residues within GABA(A) receptor beta subunits that mediate both homomeric and heteromeric receptor expression. *J Neurosci* 19, 6360-6371.

Terunuma, M., Jang, I. S., Ha, S. H., Kittler, J. T., Kanematsu, T., Jovanovic, J. N., Nakayama, K. I., Akaike, N., Ryu, S. H., Moss, S. J., and Hirata, M. (2004). GABAA receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein. *J Neurosci* 24, 7074-7084.

Tretter, V., Jacob, T. C., Mukherjee, J., Fritschy, J. M., Pangalos, M. N., and Moss, S. J. (2008). The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* 28, 1356-1365.

Tretter, V., Kerschner, B., Milenkovic, I., Ramsden, S. L., Ramerstorfer, J., Saiepour, L., Maric, H. M., Moss, S. J., Schindelin, H., Harvey, R. J., *et al.* (2011). Molecular basis of the gamma-aminobutyric acid A receptor alpha3 subunit interaction with the clustering protein gephyrin. *J Biol Chem* 286, 37702-37711.

Tretter, V., Mukherjee, J., Maric, H. M., Schindelin, H., Sieghart, W., and Moss, S. J. (2012). Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Front Cell Neurosci* 6, 23.

Triller, A., Cluzaud, F., Pfeiffer, F., Betz, H., and Korn, H. (1985). Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol* 101, 683-688.

Tyagarajan, S. K., Ghosh, H., Yevenes, G. E., Nikonenko, I., Ebeling, C., Schwerdel, C., Sidler, C., Zeilhofer, H. U., Gerrits, B., Muller, D., and Fritschy, J. M. (2011). Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 379-384.

Unwin, N. (2003). Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555, 91-95.

Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J Mol Biol* 346, 967-989.

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

Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T. C., and Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51, 741-754.

Vitanova, L., Haverkamp, S., and Wässle, H. (2004). Immunocytochemical localization of glycine and glycine receptors in the retina of the frog *Rana ridibunda*. *Cell Tissue Res* 317, 227-235.

Wan, Q., Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Braunton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F., and Wang, Y. T. (1997). Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388, 686-690.

Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J., and Olsen, R. W. (1999). GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397, 69-72.

Wang, J., Liu, S., Haditsch, U., Tu, W., Cochrane, K., Ahmadian, G., Tran, L., Paw, J., Wang, Y., Mansuy, I., *et al.* (2003). Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses. *J Neurosci* 23, 826-836.

Wang, Q., Liu, L., Pei, L., Ju, W., Ahmadian, G., Lu, J., Wang, Y., Liu, F., and Wang, Y. T. (2003). Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* 38, 915-928.

Whiting, P., McKernan, R. M., and Iversen, L. L. (1990). Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma 2 phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9966-9970.

Wu, X., Wu, Z., Ning, G., Guo, Y., Ali, R., Macdonald, R. L., De Blas, A. L., Luscher, B., and Chen, G. (2012). GABAA receptor alpha subunits play a direct role in synaptic versus extrasynaptic targeting. *J Biol Chem*.

Xia, J., Chung, H. J., Wihler, C., Huganir, R. L., and Linden, D. J. (2000). Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins. *Neuron* 28, 499-510.

Xiang, S., Kim, E. Y., Connelly, J. J., Nassar, N., Kirsch, J., Winking, J., Schwarz, G., and Schindelin, H. (2006). The crystal structure of Cdc42 in complex with collybistin II, a gephyrin-interacting guanine nucleotide exchange factor. *J Mol Biol* 359, 35-46.

Xiang, S., Nichols, J., Rajagopalan, K. V., and Schindelin, H. (2001). The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure* 9, 299-310.

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

Zhao, C., Slevin, J. T., and Whiteheart, S. W. (2007). Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett* 581, 2140-2149.

Zita, M. M., Marchionni, I., Bottos, E., Righi, M., Del Sal, G., Cherubini, E., and Zacchi, P. (2007). Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function. *Embo J* 26, 1761-1771.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Günter Schwarz für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe schreiben zu können. Auch wenn es zeitweise Rückschläge gab, hat er mich immer wieder ermuntert, mich mit seinem Enthusiasmus für dieses interessante Thema begeistert und auch gefordert.

Herrn Prof. Peter Kloppenburg danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Prof. Jochen Meier für die gute Zusammenarbeit bei den Projekten.

Ein ganz besonders großer Dank gilt allen Mitgliedern der AG Schwarz. Ohne euch, eure Aufmunterung und Ratschläge, euren Sarkasmus, das gemeinsame Kaffee trinken und Mittag essen, die Grill-Abende oder einfach nur das Mauer-Bierchen wären die letzten Jahre nur halb so schön und wesentlich anstrengender gewesen! Danke Ali, Borislav, Franziska, Jen-Chih, Jens, Joana, José, Julian, Juliane, Julika, Katrin, Luzie, Manuel, Melanie, Michael, Nastassia, Natalie, Nora, Oliver, Sabina, Sabine, Simona, Sita, Uwe und allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe.

Danke Juliane für die schöne, gemeinsame Zeit als Labor- und Schreibtischnachbarin. Ich weiß nicht, was ich ohne dich und deine Aufmunterung in jeglicher Hinsicht in den letzten fünf Jahren gemacht hätte. Irgendwie haben wir es immer wieder geschafft, uns gegenseitig Mut zuzusprechen und uns zu motivieren, was mir sehr geholfen hat.

Von Herzen bedanke ich mich bei meiner gesamten Familie für die uneingeschränkte Unterstützung, die Motivierung, das entgegengebrachte Verständnis sowie den Rückhalt während dieser anstrengenden Zeit.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meinem Freund Christian. Danke, dass du immer für mich da warst/ bist, mich uneingeschränkt unterstützt hast und es jedes Mal wieder geschafft hast mich aufzubauen. Ich bewundere dich dafür, dass du immer versucht hast meine Arbeit und meine Gedanken zu verstehen und mir dadurch sogar mit konstruktiven Ratschlägen helfen konntest!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Günter Schwarz am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen

Kowalczyk, S., Winkelmann, A., Smolinsky, B., Förstera, B., Neundorf, I., Schwarz, G. and Meier, JC. (2012). Direct binding of GABA_A receptor β 2 and β 3 subunits to gephyrin. European Journal of Neuroscience, doi:10.1111/ejn.12078.

Tagungsbeiträge

2012 SFB retreat, Wermelskirchen: Sarah Kowalczyk „Gephyrin and GABA_A receptor interaction“ (Vortrag)

2011 Konferenz Nucleo-Synaptic Cross-Talk in Nerve Cells, Mai 2011, Hamburg-Blankenese: Sarah Kowalczyk, Birthe Smolinsky, Benjamin Förstera, Carola Bernert, Jochen C. Meier & Günter Schwarz, „Direct binding of gephyrin to the GABA type A receptor beta2 subunit“ (Abstract/Poster)

2010 FENS, Juli 2010, Amsterdam: Sarah Kowalczyk, Benjamin Förstera, Carola Bernert, Günter Schwarz and Jochen C. Meier, „GABA_AR Gephyrin Interaction – A Compartment-Selective Division of Labor“ (Abstract/ Poster)

Köln, 10. Dezember 2012

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sarah Katrin Kowalczyk
Anschrift	Zülpicher Str. 413 50935 Köln
Geburtstag	24.04.1984
Geburtsort	Duisburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung/ Studium/ Beruf

seit 10/2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Promotion im Fach Biochemie Universität zu Köln, AG Prof. Schwarz „Charakterisierung der Interaktion von Gephyrin mit verschiedenen Untereinheiten des GABA _A -Rezeptors“ (Abschluss Oktober 2012)
01/2008 – 08/2008	Masterarbeit im Fach Biochemie Universität zu Köln, AG Prof. Schwarz „Glycin- und GABA _A -Rezeptoren: Expression der Liganden- Bindungsdomäne und posttranslationale Modifikationen des Rezeptor-assoziierten Proteins Gephyrin“
10/2006 – 09/2008	Masterstudium im Fach Biowissenschaften Schwerpunkt Biochemie Universität zu Köln
03/2006 – 06/2006	Bachelorarbeit im Fach Zellbiologie Westfälische Wilhelms-Universität Münster, AG Prof. Bähler „Subzelluläre Verteilung der Rho-Bindungsdomäne von mDia1“
10/2003 – 09/2006	Bachelorstudium im Fach Biowissenschaften Schwerpunkt Zellbiologie Westfälische Wilhelms-Universität Münster

07/2003 – 09/2003 Minijob Kaufhof Mülheim

07/1990 – 06/2003 Schulausbildung
Abschluss: Abitur
Freiherr-vom-Stein Gymnasium, Oberhausen

Besondere Kenntnisse

Englisch	in Wort und Schrift
Französisch	Basiskenntnisse
Russisch	rudimentäre Kenntnisse
Microsoft Office	Word, Excel, Powerpoint
Sigma Plot	Grundkenntnisse

Interessen Reisen, lesen, Sport