

Abstract

Efficient signal transmission in the central nervous system is essential for higher brain functions. Inhibitory signaling in the brain primarily takes place at GABAergic (γ -aminobutyric acid) synapses and balances the activity of excitatory synapses. GABA type A receptors (GABA_ARs) are clustered at the synapse by a scaffold with the peripheral membrane protein gephyrin as major postsynaptic protein. One key feature of synapses is their ability to adapt in response to neuronal network activities, though underlying mechanisms how these changes are orchestrated under normal and pathological conditions are poorly understood.

The first part of the study focuses on gephyrin's membrane association in neurons with the aim to elucidate the molecular mechanisms and significance of membrane tethering. Gephyrin from Sf9 insect cells, but not *E. coli*, bound to liposomes and specifically to phosphatidylinositol 4-phosphate in protein-lipid overlay assays. Furthermore, gephyrin was identified to be mainly associated with cholesterol-rich membrane microdomains in mouse brains. Posttranslational lipid modifications of synaptic proteins regulate their trafficking and membrane localization and contribute to synaptic plasticity. Using different experimental approaches, gephyrin was identified to be palmitoylated *in vivo*. Palmitoylation of gephyrin was crucial for its localization at synapses and influenced the size of gephyrin clusters and the architecture of the inhibitory synapse. Membrane release of gephyrin upon inhibition of palmitoylation led to reduced surface quantities of synaptic GABA_AR subunits. Additionally, the membrane detachment made gephyrin more susceptible to cleavage by the protease calpain I resulting in an accelerated turnover of the protein. Gephyrin palmitoylation was identified to be regulated by GABA_AR activity leading to rapid changes in gephyrin palmitoylation levels. Palmitoylation screens in hippocampal neurons identified the neurite-localized palmitoyl transferase DHHC12 and Golgi-resident DHHC16 as gephyrin palmitoylating enzymes, which increase gephyrin cluster size and its amount in synapses. Gephyrin was also identified to be physiologically S-nitrosylated by NO, which is produced by neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Pharmacological nNOS activity modulation in HEK-293 cells and hippocampal neurons reciprocally regulated gephyrin palmitoylation. Together, these findings identify differential modification of gephyrin by palmitoylation and nitrosylation and suggest that palmitoylation dynamics of gephyrin contribute to the regulation of GABAergic activity-dependent plasticity.

Inhibitory signaling is crucial to counterbalance excitatory transmission. Anomalous inhibitory circuits and particularly irregular gephyrin expression have been linked to epileptic disorders. Patients with idiopathic generalized epilepsy have been screened for mutations in the *GPHN* gene. In the second part, a patient was identified with a hemizygous mutation in *GPHN* resulting in the expression of a truncated gephyrin variant that failed to oligomerize at inhibitory synapses. This pathogenic variant acted dominant-negatively on regular gephyrin and disrupted the normal gephyrin scaffold and synaptic GABA_AR clustering in hippocampal neurons. The results suggest that mutations in genes coding for proteins of the inhibitory synapse is an important mechanism in the pathophysiology of monogenetic epilepsy forms.

Zusammenfassung

Effiziente Signalweiterleitung im zentralen Nervensystem ist essenziell für höhere Gehirnfunktionen. Inhibitorische Signale werden im Gehirn überwiegend über GABAerge (γ -Aminobuttersäure) Synapsen weitergeleitet, die die erregende Aktivität im neuronalen Netzwerk balancieren. GABA Typ A Rezeptoren ($\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$) werden an der Synapse durch ein Gerüst bestehend aus dem peripherem Membranprotein Gephyrin geclustert. Ein Hauptmerkmal von Synapsen ist die Fähigkeit sich der Aktivität im neuronalen Netzwerk anzupassen, wenngleich die zugrunde liegenden Mechanismen, wie diese Änderungen unter normalen und pathologischen Bedingungen koordiniert werden, nicht hinreichend verstanden sind.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Membranassoziation von Gephyrin in Neuronen mit dem Ziel die molekularen Mechanismen und Bedeutung der Membranbindung aufzuklären. Rekombinantes Gephyrin aus Sf9 Insektenzellen, aber nicht aus *E. coli*, konnte an Liposomen und spezifisch an Phosphatidylinositol 4-phosphate binden. Des Weiteren wurde Gephyrin überwiegend assoziiert mit Cholesterin-reichen Mikrodomänen in Membranen von Mausgehirnen gefunden. Posttranslationale Lipidmodifikationen von synaptischen Proteinen regulieren deren Sortierung und Membranlokalisierung und tragen dadurch zu synaptischer Plastizität bei. Durch verschiedene Methoden konnte gezeigt werden, dass Gephyrin *in vivo* palmitoyliert wird. Palmitoylierung von Gephyrin war entscheidend für die synaptische Lokalisierung von Gephyrin und beeinflusste dadurch die Größe von Gephyrin-Clustern und die Architektur der inhibitorischen Synapse. Das Ablösen von Gephyrin von der Membran durch Inhibierung der Palmitoylierung führte zur Reduktion der Anzahl von synaptischen $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ Untereinheiten an der Zelloberfläche. Zusätzlich führte die Ablösung von der Membran zur Degradation von Gephyrin, bedingt durch erhöhte Zugänglichkeit der Protease Calpain I. Die Palmitoylierung von Gephyrin wurde durch die Aktivität der $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ reguliert, was zu einer schnellen Änderung der Menge an Gephyrin-Palmitoylierung führte. Expressionsstudien in hippocampalen Neuronen haben die Neuriten-lokalisierte Palmitoyltransferase DHHC12 und die Golgi-gebundene DHHC16 als Gephyrin-palmitoylierende Enzyme identifiziert, welche die Gephyrincluster und dadurch die Menge an synaptischem Gephyrin vergrößern. Es wurde zudem die Nitrosylierung von Gephyrin durch NO, produziert durch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), nachgewiesen. Pharmakologische Modifikation der nNOS-Aktivität in HEK-293 Zellen und hippocampalen Neuronen haben zur reziproken Regulation der Gephyrin Palmitoylierung geführt. Alle Ergebnisse gemeinsam decken die Modifikation von Gephyrin durch Palmitoylierung und Nitrosylierung auf und lassen vermuten, dass die dynamische Palmitoylierung von Gephyrin an der aktivitätsgesteuerten GABAergen Plastizität beteiligt ist.

Inhibitorische Reizweiterleitung ist essenziell für den Ausgleich von exzitatorischen Strömen. Abnormale inhibitorische Signale und insbesondere fehlerhafte Gephyrinexpression wurden mit Epilepsie in Verbindung gebracht. Es wurden Patienten mit idiopathischer generalisierter Epilepsie auf Mutationen im *GPHN* Gen untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Patient mit hemizygoter Deletion im *GPHN* Gen identifiziert, was in der Expression einer verkürzten Gephyrin Variante resultierte, die nicht in der Lage war an der inhibitorischen Synapse zu oligomerisieren. Diese pathogene Variante wirkte domain-negativ auf reguläres Gephyrin in hippocampalen Neuronen und inhibierte die Clusterung des nativen Gephyringerüsts sowie der $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ an der Synapse. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Mutationen in Genen, die für Proteine der inhibitorischen Synapsen kodieren, einen wichtigen Mechanismus in der Pathophysiologie von monogenen Epilepsieformen darstellen.