

ABSTRACT

Signal processing and transmission in neuronal networks crucially depend on rapid and directed informational transfer at synaptic contacts. Formation and maintenance of synapses are highly dynamic processes that require concise regulation. A high local density of ion channel receptors at inhibitory synapses is ensured by the scaffold protein gephyrin that plays a decisive role in anchoring glycine and a major subset of γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors in the postsynaptic membrane. Despite great progress that has been made concerning the molecular mechanism of inhibitory synapse formation, many aspects of gephyrin-dependent receptor clustering remain poorly understood. It is, however, evident that posttranslational modifications substantially contribute to the complexity of these events.

Only recently, it could be demonstrated that palmitoylation is a novel determinant of synaptic gephyrin clustering. Following initial studies using pharmacological approaches, it was now indispensable to specifically address the physiological impact of gephyrin palmitoylation at the synapse.

This first part of this thesis describes the identification of palmitoylation sites in gephyrin by utilizing the acyl-biotin exchange technique and mass spectrometry. Substitution of crucial cysteine residues caused significant changes in gephyrin cluster size and quantity in primary neurons. A combination of pharmacological and gene knockdown approaches indicates that remaining clustering of palmitoylation-deficient gephyrin is independent of the endogenous protein. Further experiments revealed specific, palmitoylation-dependent binding of gephyrin to phosphoinositides, suggesting a complex interplay of protein-protein and protein-lipid interactions in gephyrin-mediated scaffold formation.

In the second part of this study, regulatory processes of gephyrin palmitoylation and depalmitoylation were investigated. By using microscopic and biochemical analyses, the contribution of a number of thioesterases to the depalmitoylation of gephyrin could be excluded. Furthermore, specific regulatory aspects of gephyrin palmitoylation levels by nitrosylation and phosphorylation at individual serine residues were disproved. Altogether, the here obtained results imply the existence of a complex regulatory network in postsynaptic gephyrin clustering that involves palmitoylation and other posttranslational modifications with overlapping functions. The issues in this thesis provide novel working hypotheses that suggest completely new mechanistic aspects of gephyrin function and will help to shed light on the entirety of molecular processes underlying synaptic gephyrin clustering and GABAergic plasticity.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Signalverarbeitung und -weiterleitung in neuronalen Netzwerken beruhen entscheidend auf der schnellen und gezielten Informationsübertragung an synaptischen Kontakten. Ausbildung und Aufrechterhaltung von Synapsen sind hochdynamische Prozesse die eine präzise Regulierung erfordern. Eine hohe lokale Dichte von Ionenkanalrezeptoren an inhibitorischen Synapsen wird durch das Gerüstprotein Gephyrin gewährleistet, welches eine entscheidende Rolle in der Verankerung von Glycin- und einer Vielzahl von γ -Aminobuttersäure Typ A (GABA_A)-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran spielt. Trotz großer Fortschritte, die in Bezug auf das molekulare Verständnis der Bildung von inhibitorischen Synapsen erzielt wurden, bleiben viele Aspekte der Gephyrin-abhängigen Rezeptor-Clusterung unzureichend verstanden. Es ist allerdings erwiesen, dass posttranslationale Modifikationen erheblich zur Komplexität dieser Vorgänge beitragen.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Palmitoylierung ein neuartiger Bestimmungsfaktor in der synaptischen Clusterung von Gephyrin ist. Nach anfänglichen Untersuchungen mittels pharmakologischer Ansätze war es nun unerlässlich die physiologische Bedeutung der Gephyrin-Palmitoylierung an der Synapse gezielt zu behandeln.

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt die Identifizierung von Palmitoylierungsstellen in Gephyrin mit Hilfe der Acyl-Biotin Austausch Methode und Massenspektrometrie. Die Substitution essentieller Cysteine bewirkte signifikante Veränderungen in der Größe und Anzahl von Gephyrin-Clustern in primären Neuronen. Eine Kombination aus pharmakologischen und Gen-Knockdown Ansätzen deutet darauf hin, dass die verbleibende Clusterung von Palmitoylierungs-defizientem Gephyrin unabhängig vom endogenen Protein erfolgt. Weitere Experimente zeigten eine spezifische, Palmitoylierungs-abhängige Bindung von Gephyrin an Phosphoinositide und legen somit ein komplexes Zusammenspiel von Protein-Protein und Protein-Lipid-Interaktionen in der Gephyrin-vermittelten Gerüstausbildung nahe.

Im zweiten Teil dieser Studie wurden regulatorische Prozesse der Gephyrin-Palmitoylierung und -Depalmitoylierung untersucht. Durch die Verwendung mikroskopischer und biochemischer Analysen konnte die Beteiligung einer Reihe von Thioesterasen an der Depalmitoylierung von Gephyrin ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden spezifische Aspekte in der Regulierung der Palmitoylierungslevel von Gephyrin durch Nitrosylierung und Phosphorylierung bestimmter Serinreste wiederlegt. Insgesamt implizieren die hier erzielten Ergebnisse die Existenz eines komplexen regulatorischen Netzwerkes in der postsynaptischen Gephyrin-Clusterung, welches Palmitoylierung und andere posttranslationale Modifikationen mit überlappenden Funktionen umfasst. Die Sachverhalte in dieser Arbeit liefern innovative Arbeitshypothesen, die völlig neue mechanistische Aspekte in der Funktion von Gephyrin andeuten und letztlich dabei helfen werden, Aufschluss über die Gesamtheit der molekularen Mechanismen synaptischer Gephyrin-Clusterung und GABAerger Plastizität zu geben.