

Zusammenfassung

Die schnelle und effektive Informationsverarbeitung und Reizweiterleitung ist essentiell für die Funktion des Nervensystems, deshalb ist die räumliche Konzentration, die Bildung des sogenannten Clusters, von Neurotransmitter-Rezeptoren an Synapsen grundlegend. Das Gerüstprotein Gephyrin ein wichtiger Bestandteil hemmender Synapsen, um Glycin und Typ A γ -Aminobuttersäure Rezeptoren (GlyR & GABA_AR) an der Postsynapse zu konzentrieren und verankern. GABA_AR können in vielen Untereinheiten-Kombinationen auftreten, aber es konnte gezeigt werden, dass die synaptischen α und β Untereinheiten über ihre große cytoplasmatische Domäne direkt an Gephyrin binden. Gephyrin wird zwar ubiquitär exprimiert, aber alternatives Spleißen führt zu einer gewebetypischen Spezifität. Die größte Spleißkassette, C3, wird in der Leber und Gliazellen vorgefunden und übernimmt daher vermutlich die Funktion von Gephyrin in der Molybdän Cofaktor Biosynthese. Die C4 Spleißkassetten werden vorwiegend in Nervenzellen exprimiert und sind somit vermutlich an der Rezeptor-Verankerung beteiligt. Obwohl die Spleißkassetten stark konserviert sind, ist ihre spezielle Rolle im Organismus noch nicht genauer bekannt.

Der erste Teil dieser Arbeit konzentriert sich auf die Funktion einzelner Spleißkassetten in Nervenzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Level aller C4-Spleißkassetten zu Beginn der Synaptogenese ansteigen, jedoch ähnliche Expressionsprofile während der Entwicklung aufweisen. In Abhängigkeit von synaptischer Aktivität zeigten sich Unterschiede in der Expression verschiedener Spleißkassetten in hippocampalen und kortikalen Neuronen. Die neuronale Expression von rekombinanten Gephyrin Varianten offenbarte Spleißkassetten-spezifische Auswirkungen auf Gephyrin und GABA_AR $\alpha 2$ Untereinheit-enthaltende Cluster. Zudem wurden Spleißkassetten-spezifische KO Mäuse generiert und erste Analysen bezüglich Gephyrin und GABA_AR Cluster durchgeführt. Diese Mäuse helfen bei der Charakterisierung von Gephyrin Spleißkassetten auf molekularer Ebene und deren Einfluss auf das Verhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird beschrieben, wie ein Modellsystem für pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle basierend auf der pentameren Lumazin Synthase aus Hefe für GABA_AR angepasst wurde. Dies ermöglicht die Analyse der Bindungseigenschaften von Gephyrin und den cytoplasmatischen Rezeptor Domänen in einer physiologischen Assemblierung. Hier muss jedoch das Protokoll verbessert werden, um sensitivere Interaktionsstudien durchführen zu können.

Schließlich wurden mögliche epilepsieauslösende Mutationen in der GABA_AR $\gamma 2$ Untereinheit auf molekularer und biochemischer Ebene untersucht. Hierbei wurden verschiedene Mechanismen gefunden, die potentiell zur Entwicklung von Epilepsie führen können.

Abstract

The nervous system crucially depends on fast and effective processing of information and signal transmission at synaptic contacts. Therefore, localization of neurotransmitter receptors in exact opposition to presynaptic release sites is instrumental. At inhibitory synapses of the brain and spinal cord, gephyrin is the main scaffolding protein to anchor and cluster pentameric γ -aminobutyric A receptors (GABA_AR) and glycine receptors (GlyR), respectively. A high diversity of GABA_AR subunits has been identified, but the most common postsynaptic α and β subunits were shown to directly bind to gephyrin via their large cytoplasmic loops. Although gephyrin is ubiquitously expressed, tissue specificity is generated by extensive alternative splicing. A high diversity of gephyrin is created by splice cassettes localized to the C domain. The largest splice cassette, C3, is prominent in liver and glia cells in the brain and is assumed to fulfill the metabolic function in molybdenum cofactor biosynthesis. The three rodent splice cassettes of the C4 cluster are predominantly expressed in neurons and hence expected to contribute to receptor clustering. These splice cassettes are highly conserved in mammals, however, the role of specific splice cassettes in the organism remains poorly understood.

The first part of this work focuses on the function of the single splice cassettes in neurons. It could be shown that mRNA levels of all C4-cassettes increase with onset of synaptogenesis *in vitro*. However, in response to altered inhibitory neuronal activity splice cassette expression was differently affected in hippocampal and cortical neurons. Furthermore, neuronal expression of recombinant gephyrin variants revealed splice cassette-dependent effects on gephyrin and $\alpha 2$ subunit-containing GABA_AR cluster formation and localization. Moreover, splice cassette-specific KO mouse lines were generated and first analyses of gephyrin and GABA_AR clusters could be performed, which lay the groundwork for the analysis of gephyrin and GABA_AR clusters *in vivo*. Furthermore, these mice provide a novel tool to study the physiology of gephyrin splice variants on the molecular and behavioral level.

The second part of this thesis reports on the adaptation of a model system for pentameric ligand-gated ion channels based on the yeast pentameric lumazine synthase to GABA_ARs. This will allow for studies on the interaction of gephyrin and the cytoplasmic GABA_AR loops in a physiologically-relevant pentameric assembly. However, the protocol requires further refinement to improve protein yield and heteropentameric assembly, which is crucial to perform highly sensitive and quantitative interaction studies.

In the final part, putative epileptogenic mutations in the $\gamma 2$ subunit of GABA_ARs were analyzed on a molecular and biochemical level and different mechanisms were identified as a molecular cause of the pathology of a childhood-onset epilepsy syndrome.