



Doctoral Thesis

Activity-dependent regulation of GABA_A receptors

Author(s):

Penschuck, Silke

Publication Date:

1998

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001917752> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Activity-dependent regulation of GABA_A-receptors

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Science



Presented by

Silke Penschuck

Dipl. Biol., University of Hannover

born September 17th, 1968

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Möhler, examiner

Prof. Dr. A. Borbély, co-examiner

PD Dr. J.-M. Fritschy, co-examiner

1998

B. Summary

γ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). GABAergic transmission is essential for controlling and coordinating neuronal activity in the brain. The fast synaptic action of GABA is mediated by GABA_A-receptors, which form pentameric chloride channels assembled from a family of at least 17 subunits (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, ρ 1-3, δ , ϵ). The combinatorial assembly of these subunits determines the pharmacological and physiological properties of GABA_A-receptor subtypes. The function of GABA_A-receptors can be allosterically modulated by a multitude of endogenous and exogenous ligands, such as benzodiazepines. In addition, they carry intracellular phosphorylation sites for posttranslational regulation by various protein kinases and phosphatases.

Activity-dependent regulation of receptors enables neuronal networks to maintain the balance between excitation and inhibition and represents an important facet of synaptic plasticity. The modulation of GABA_A-receptors is of major relevance for remodeling of sensory maps during development and after injury, and may underly the pathophysiology of epilepsy. The molecular mechanisms of activity-dependent regulation of GABA_A-receptors are largely unknown, although there is evidence for the involvement of neurotrophins, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF). In this study, we have characterized immunohistochemically and biochemically short- and long-term effects of synaptic activity and of BDNF on the expression of GABA_A-receptors *in vivo* and *in vitro*. The present report is divided into three parts:

1) *Short-term regulation of GABA_A-receptors by phosphorylation:* BDNF has been shown to reduce the strength of GABAergic inhibition. We now demonstrate that BDNF regulates the cell surface expression of GABA_A-receptors on a short time scale in hippocampal neurons *in vitro*. Exposure to BDNF induces a down-regulation of GABA_A-receptors that is accompanied by dephosphorylation of the γ 2 and β 2/3 subunits and prevented by inactivation of the protein phosphatase calcineurin. Therefore, activity-dependent enhancement of neurotransmission, such as occurs during long-term potentiation (LTP), might involve a reduction of the number of GABA_A-receptors at synaptic sites.

2) *Regulation of GABA_A-receptor gene promoter activity:* In the kindling model of epilepsy, long-term effects of neuronal activity include changes in mRNA levels of major GABA_A-receptor subunits suggesting adaptation to repeated seizures. However, it is not

known whether these changes are based on activation of gene expression or on the stabilization of mRNAs. By using transgenic mice carrying a lacZ reporter gene coupled to the GABA_A-receptor δ subunit promoter, we demonstrate that acute seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) alter GABA_A-receptor gene promoter activity. Single seizures evoked by a convulsant dose of PTZ cause a transient increase in promoter activity of the transgene, as monitored by β -galactosidase immunohistochemistry. However, after repeated administration of initially subconvulsive doses of PTZ (PTZ-kindling), no changes in transgene expression were observed. These results point to the responsiveness of the GABA_A-receptor δ subunit gene promoter only in case of an acute seizure. The process of chemical kindling suppresses the activation of the gene promoter, an effect that may contribute to kindling-induced epileptogenesis.

3) *Regulation of GABA_A-receptor expression during maturation of rat primary somatosensory cortex (S1)*: Innervation of the cortical anlage by ventrobasal thalamic afferents is a key event in the formation of whisker-related patterns (barrels) during development of S1. Thalamic afferents induce a laminar redistribution of GABA_A-receptor subtypes in S1, suggesting that GABA_A-receptor subunits are molecular targets for thalamic regulation. We have investigated whether thalamocortical activity determines the cytoarchitectonic differentiation of S1 and the laminar distribution of GABA_A-receptor subunits. Chronic local blockade of NMDA-receptors by MK-801 released from Elvax polymers implanted over the parietal cortex at birth results in an increase of the size of barrels, as reflected by the expression pattern of the GABA_A-receptor $\alpha 1$ subunit, whereas chronic infusion of BDNF has the opposite effect. These pharmacological manipulations of neuronal activity has no influence on the laminar distribution or on the expression levels of GABA_A-receptor subunits. Thus, the area-specific expression pattern of these receptors seems to be regulated by factors independent of thalamocortical activity.

C. Zusammenfassung

γ -aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (CNS). GABAerge Transmission ist unerlässlich zur Kontrolle und Koordination neuronaler Aktivität im Gehirn. Die schnelle synaptische Wirkung von GABA wird von GABA_A-Rezeptoren, pentameren Chloridkanälen gebildet aus einer Familie von mindestens 17 verschiedenen Untereinheiten (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, ρ 1-3, δ , ϵ), vermittelt. Die kombinatorische Zusammenstellung dieser Untereinheiten bestimmt die pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften der GABA_A-Rezeptoren. Die Funktion der GABA_A-Rezeptoren kann allosterisch durch eine Vielzahl endogener und exogener Substanzen moduliert werden, darunter die Benzodiazepine. Zusätzlich enthalten GABA_A-Rezeptoren intrazelluläre Phosphorylierungsstellen zur posttranslationalen Regulation durch verschiedene Proteinkinasen und Phosphatasen. Eine aktivitätsabhängige Regulation von Rezeptoren stellt eine Möglichkeit dar, wie neuronale Netzwerke die Balance zwischen Erregung und Hemmung erhalten könnten. Die Modulation von GABA_A-Rezeptoren spielt bei synaptischer Plastizität, bei der Restrukturierung sensorischer Karten während der Entwicklung und auch bei der Entstehung von Epilepsien eine Rolle. Die molekularen Mechanismen aktivitätsabhängiger Regulation von GABA_A-Rezeptoren sind nur wenig bekannt, allerdings scheinen neurotrophe Faktoren, wie z.B. *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dabei eine Rolle zu spielen. In dieser Arbeit haben wir Kurz- und Langzeiteffekte von neuronaler Aktivität und von BDNF auf die Expression von GABA_A-Rezeptoren *in vivo* und *in vitro* immunhistochemisch und biochemisch charakterisiert.

1) *Schnelle Regulation von GABA_A-Rezeptoren durch Phosphorylierung*: Es ist elektrophysiologisch gezeigt worden, dass BDNF GABAerge Inhibition abschwächt. Wir haben jetzt herausgefunden, dass BDNF sehr schnell die Membranexpression von GABA_A-Rezeptoren in Hippocampusneuronen *in vitro* reguliert. Eine BDNF-induzierte Herunterregulierung von GABA_A-Rezeptoren ging mit einer Dephosphorylierung der γ 2 und β 2/3 Untereinheiten einher und konnte durch Inaktivierung der Phosphatase Calcineurin verhindert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass die aktivitätsabhängige Steigerung synaptischer Neurotransmission, wie sie während Langzeit-Potenzierung (LTP) stattfindet, die Regulation der Anzahl von GABA_A-Rezeptoren einschliesst.

2) *Langzeit-Regulation der Genexpression von GABA_A-Rezeptoren: Epileptisches Kindling beeinflusst die mRNA-Expression von GABA_A-Rezeptoren.* Es ist allerdings nicht bekannt, ob die Änderungen der mRNA-Expression aus der Aktivierung von Genexpression oder der Stabilisierung der mRNAs resultieren. Mit Hilfe einer transgenen Mauslinie, die ein Fusionsgen aus dem *LacZ-reporter*-Gen und Sequenzen des GABA_A-Rezeptor- δ -Untereinheit-Promotors exprimiert, konnten wir zeigen, dass durch Pentylentetrazol (PTZ) -Kindling hervorgerufene Veränderungen in der Genexpression von GABA_A-Rezeptoren auf der Ebene der Genpromotor-Aktivität stattfinden. Akute, durch PTZ verursachte epileptische Krämpfe erhöhen die durch β -Galaktosidase-Histochemie visualisierte Aktivität des Transgen-Promotors vorübergehend. Im Gegensatz dazu konnten nach wiederholter Verabreichung zu Beginn subkonvulsiver Dosen von PTZ keine Veränderungen in der Expression des Transgens beobachtet werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der GABA_A-Rezeptor- δ -Untereinheit-Promotor im Falle eines akuten epileptischen Anfalles aktivierbar ist. Der Prozess des chemischen Kindlings hemmt diese Aktivierung des Genpromotors, was zur Entstehung einer Epilepsie durch Kindling führen könnte.

3) *Die Rolle thalamocorticaler Aktivität bei der Regulation der Expression von GABA_A-Rezeptoren während der Entwicklung des primären somatosensorischen Cortex (S1) der Ratte:* Innervation der corticalen Anlage durch die ventrobasalen thalamischen Afferenzen ist ein Schlüsselereignis für die Bildung somatotopischer Muster (*barrels*) während der Entwicklung von S1. Thalamische Afferenzen induzieren eine schichtspezifische Umverteilung von GABA_A-Rezeptor Untertypen, was vermuten lässt, dass GABA_A-Rezeptor Untereinheiten molekulare Zielstrukturen der thalamischen Afferenzen darstellen. Wir haben untersucht, ob thalamocorticale Aktivität die zytoarchitektonische Differenzierung und schichtspezifische Verteilung von von GABA_A-Rezeptoren beeinflusst. Chronische lokale Blockade von NMDA-Rezeptoren durch MK-801, freigesetzt aus Elvax-Polymeren, die nach Geburt auf den Parietallappen implantiert wurden, führte zur Vergrößerung der barrels visualisiert durch GABA_A-Rezeptor $\alpha 1$ Untereinheiten-Färbung. Chronische Infusion von BDNF erzeugte den entgegengesetzten Effekt. Die pharmakologische Manipulation neuronaler Aktivität hatte keinen Einfluss auf die schichtspezifische Verteilung oder die Expressionsstärke von GABA_A-Rezeptor Untereinheiten. Die Entstehung des arealspezifischen Expressionsmusters dieser Rezeptoren findet also auch in Abwesenheit thalamocorticaler Aktivität statt.