

Synaptic Clustering 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
Christian Essrich
Dipl. Biol., University of Freiburg
born July 23rd, 1963
citizen of Germany

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Möhler, examiner
Prof. Dr. U. Suter, co-examiner

Zusammenfassung

Die 'schnelle' inhibitorische Neurotransmission im Gehirn wird hauptsächlich durch den GABA_A-Rezeptor (GABA_AR) vermittelt, einen heteromeren Chlorid-Kanal, der durch γ -Aminobuttersäure (GABA) gesteuert wird. Die meisten Subtypen von GABA_AR sind in der postsynaptischen Membran von GABAergen Synapsen konzentriert, und bestehen aus verschiedenen α - und β -Untereinheiten und der γ_2 -Untereinheit. Während die γ_2 -Untereinheit für die Bildung und den Transport der Rezeptoren zur Zell-Oberfläche entbehrlich ist, wird sie für die Modulation der GABA_AR durch Benzodiazepine benötigt. Die synaptische Lokalisation ist eine Voraussetzung für die inhibitorische synaptische Wirkung von GABA_AR. Die zugrundeliegenden Mechanismen der postsynaptischen Aggregation dieser Rezeptoren sind jedoch weitgehend unbekannt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die potentielle Rolle der γ_2 -Untereinheit für diese Aggregation der GABA_AR *in vivo* untersucht. Die Analyse von Neuronen aus Mäusen, denen die γ_2 -Untereinheit fehlt ($\gamma_2^{0/0}$) ergab, dass diese Untereinheit für die postsynaptische Aggregation von häufigen GABA_AR-Subtypen notwendig ist. Der Verlust von GABA_AR-Aggregaten in $\gamma_2^{0/0}$ Neuronen war vom Verlust des synaptischen Verankerungs-Proteins Gephyrin und dem Verlust von synaptischer GABAerger Aktivität begleitet. Umgekehrt bewirkte die Inhibition der Gephyrin-Expression in Wildtyp-Neuronen den Verlust von synaptischen GABA_AR-Aggregaten. Dies zeigt, dass die γ_2 -Untereinheit und Gephyrin voneinander abhängige Komponenten des gleichen synaptischen Komplexes sind, und, dass sie von wesentlicher Bedeutung für die postsynaptische Aggregation der meisten GABA_AR-Subtypen *in vivo* sind.

Die γ_3 -Untereinheit ist homolog zur γ_2 -Untereinheit und hat ähnliche pharmakologische und physiologische Eigenschaften, wenn sie zusammen mit α - und β -Untereinheiten *in vitro* exprimiert wird. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit die γ_3 -Untereinheit die γ_2 -Untereinheit bei der synaptischen Aggregation der GABA_AR *in vivo* ersetzen kann. Durch transgene Überexpression der γ_3 -Untereinheit in $\gamma_2^{0/0}$ Mäusen wurde ein wesentlicher Anteil an Benzodiazepin-sensitiven, funktionellen, postsynaptischen GABA_AR wiederhergestellt. Darüberhinaus konnte die γ_3 -Untereinheit die γ_2 -Untereinheit teilweise bei der Bildung von GABA_AR ersetzen, die in Synapsen konzentriert waren und mit Gephyrin *in vivo* kolokalisierten. Die Fähigkeit zur Aggregation von GABA_AR und Gephyrin wurde auch bei der endogenen γ_3 -Untereinheit beobachtet, aber nur im Gehirn von $\gamma_2^{0/0}$ Mäusen. Die γ_2 - und γ_3 -Untereinheit stimmen also funktionell dahingehend überein, dass sie die postsynaptische Aggregation von GABA_AR und Gephyrin *in vivo* vermitteln können.

Summary

Fast inhibitory neurotransmission in the brain is mediated mainly by γ -aminobutyric acid (GABA)-gating of heteromeric GABA_A receptor chloride channels (GABA_AR). Most types of GABA_ARs are preferentially localized in the postsynaptic membrane of GABAergic synapses, and consist of diverse α and β subunits together with the γ_2 subunit. Whereas the γ_2 subunit is dispensable for assembly and translocation of functional receptors to the cell surface, it is required for modulation of GABAergic function by benzodiazepines. Synaptic localization of GABA_ARs is a prerequisite for inhibitory synaptic function, but the mechanisms by which the synaptic clustering of receptors is regulated are poorly understood.

In the first part of the project, a possible role of the γ_2 subunit for receptor clustering *in situ* was investigated. By analyzing γ_2 subunit-deficient ($\gamma_2^{0/0}$) neurons, it was found that this subunit was required for postsynaptic clustering of major GABA_AR subtypes. Loss of GABA_AR clusters in $\gamma_2^{0/0}$ neurons was paralleled by loss of the synaptic clustering molecule gephyrin and loss of synaptic GABAergic function. Conversely, inhibition of gephyrin expression in wild-type neurons resulted in loss of synaptic GABA_AR clusters. The γ_2 subunit and gephyrin are thus interdependent components of the same synaptic complex and of major importance for postsynaptic clustering of abundant subtypes of GABA_ARs *in vivo*.

The γ_3 subunit is a closely related homologue of the γ_2 subunit and shows similar pharmacological and physiological properties when coexpressed with α and β subunits *in vitro*. In the second part of the project, it was analyzed whether the γ_3 subunit could substitute for the γ_2 subunit in synaptic clustering of GABA_ARs *in vivo*. Transgenic overexpression of the γ_3 subunit in $\gamma_2^{0/0}$ mice resulted in a significant restoration of benzodiazepine-sensitive, functional, postsynaptic GABA_ARs. Moreover, the γ_3 subunit was able to partially substitute for the γ_2 subunit in the formation of GABA_ARs that are synaptically clustered and colocalized with gephyrin *in vivo*. The GABA_AR and gephyrin clustering properties were also observed for the endogenous γ_3 subunit, but only in the $\gamma_2^{0/0}$ brain. Thus, the γ_2 and γ_3 subunits are functionally similar in their ability to promote the clustering of GABA_ARs and gephyrin at postsynaptic sites *in vivo*.