

**Postsynaptic clustering of GABA<sub>A</sub> receptors  
by the  $\gamma 3$  subunit *in vivo***

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

Presented by

**Kristin Baer**

Dipl. Biol., University of Bielefeld  
born August 19th, 1970  
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. Möhler, examiner  
Prof. Dr. P. Sonderegger, co-examiner

1999

## 1. Zusammenfassung

GABA<sub>A</sub> Rezeptoren sind Mitglieder der Liganden-gesteuerten Superfamilie der Ionenkanäle. Strukturell repräsentieren sie hetero-pentamere Komplexe, für deren Untereinheiten eine gemeinsame Membrantopologie vorgeschlagen wird. Jede Untereinheit besteht aus einer grossen N-terminalen extrazellulären Domäne und vier Transmembrandomänen mit einem ausgedehnten intrazellulären Bereich zwischen den Transmembranregionen drei und vier. Differentielle Expression und Assemblierung der Untereinheiten führen zu einer grossen Anzahl von spezifischen Rezeptorsubtypen, die sich bemerkenswerterweise in der Pharmakologie der Benzodiazepinbindungsstelle des Rezeptors unterscheiden. Zusätzlich scheinen spezifische Verankerungsmechanismen bei der subzellulären Lokalisierung von verschiedenen Rezeptorsubtypen eine Rolle zu spielen. Die meisten Rezeptorsubtypen bestehen aus verschiedenen  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten zusammen mit der  $\gamma 2$  Untereinheit. Die GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, die die  $\gamma 2$  Untereinheit enthalten, werden konzentriert an postsynaptischen Stellen gefunden, wo sie mit Gephyrin, einem möglichen Verbindungsprotein von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren und dem Zytoskelett, co-lokalisieren. Andere mögliche Verankerungsproteine beinhalten GABARAP, ein an Microtubuli assoziiertes Protein, das aufgrund seiner Interaktion mit der intrazellulären Region der  $\gamma 2$  Untereinheit identifiziert wurde. Interessanterweise existiert die  $\gamma 2$  Untereinheit in zwei alternativen Splice-Varianten,  $\gamma 2S$  und  $\gamma 2L$ , die sich durch ein Exon von acht Aminosäuren, das stromabwärts von der GABARAP-Bindungsstelle liegt, unterscheiden. Dieser Teil der  $\gamma 2$  Untereinheit könnte signifikant zur cytoplasmatischen Oberfläche von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren beitragen, aber die funktionelle Bedeutung dieser alternativ gespleichten Region ist bis jetzt unbekannt. Die  $\gamma 1$  und  $\gamma 3$  Untereinheiten sind gemäss *in vitro* Studien strukturell und funktionell eng verwandt mit der  $\gamma 2$  Untereinheit. Ihre Rolle *in vivo* ist bisher jedoch wenig verstanden.

Mäusen, denen eine funktionelle  $\gamma 2$  Untereinheit fehlt, exprimieren eine fast normale Anzahl von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, die jedoch funktionell beeinträchtigt sind. Die Defizite beinhalten (i) einen Mangel an Modulation durch Benzodiazepine (BZ), (ii) reduzierte Kanalleitfähigkeit, (iii) das Unvermögen der Cluster-Bildung an postsynaptischen Stellen und (iv) eine beeinträchtigte subsynaptische Membranspezialisierung, wie an dem Fehlen von postsynaptischen Gephyrin-Clustern sichtbar ist. Die regionale Expression der endogenen  $\gamma 1$  und  $\gamma 3$  Untereinheiten erscheint in Mäusen ohne  $\gamma 2$  Untereinheit unverändert und es scheint als könnten sie den Funktionmangel der  $\gamma 2$  Untereinheit *in vivo* nicht ersetzen.

Als Teil dieser Doktorarbeit wurde analysiert, ob ektopische Ueberexpression von entweder der  $\gamma 2S$ ,  $\gamma 2L$  oder der  $\gamma 3$  Untereinheit dem Prinzip nach die verschiedenen Funktionen der endogenen  $\gamma 2$  Untereinheit *in vivo* ersetzen könnte. Insbesondere wurde Wert auf die Frage gelegt, ob Transgen-gesteuerte ektopische Ueberexpression dieser Untereinheiten den Mangel an postsynaptischem Clustering und synaptischer Funktion, der in Neuronen ohne  $\gamma 2$  Untereinheit beobachtet wurde, ersetzen könnte. Zu diesem Zweck wurden transgene Mäuse gezüchtet und analysiert, die entweder die  $\gamma 2S$ ,  $\gamma 2L$  oder die  $\gamma 3$  Untereinheit vor einem genetischen Hintergrund ohne  $\gamma 2$  Untereinheit überexprimieren ( $\gamma 2S^{tg}/\gamma 2^{0/0}$ ,  $\gamma 2L^{tg}/\gamma 2^{0/0}$  or  $\gamma 3^{tg}/\gamma 2^{0/0}$ ). Transgene Mäuse, die entweder die  $\gamma 2S$  oder die  $\gamma 2L$  Untereinheit vor dem Hintergrund der fehlenden  $\gamma 2$  Untereinheit überexprimieren, waren phänotypisch normal und synaptische Cluster-Bildung und postsynaptische Zielfindung der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren wurde wie bei Wildtyptieren wiederhergestellt. Ueberexpression der  $\gamma 3$  Untereinheit in Mäusen ohne  $\gamma 2$  Untereinheit stellte Benzodiazepinbindungsstellen, Benzodiazepin-modulierte Ganzzellströme und postsynaptische Miniaturströme wieder her, was auf die Bildung funktioneller postsynaptischer Rezeptoren hinweist. Ausserdem kann die  $\gamma 3$  Untereinheit die  $\gamma 2$  Untereinheit bezüglich der Cluster-Bildung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, die *in vivo* mit Gephyrin co-lokalisieren, ersetzen. Die Eigenschaften dieser Rezeptoren mit ektopischer  $\gamma 3$  Untereinheit wurden auch angewandt auf Rezeptoren mit nativer  $\gamma 3$  Untereinheit gefunden. Dennoch litten  $\gamma 3^{tg}/\gamma 2^{0/0}$  Mäuse unter früher postnataler Sterblichkeit, ähnlich wie  $\gamma 2^{0/0}$  Mäuse.

Es wird angenommen, dass Cluster-Bildung und subzelluläre Lokalisierung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren wenigstens zu einem Teil durch Interaktion mit spezifischen Proteinen gesteuert wird, die die Rezeptoren mit dem subsynaptischen Zytoskelett verknüpfen. Deshalb bestand ein zweites Ziel darin, mögliche Proteine, die mit GABA<sub>A</sub> Rezeptoruntereinheiten und Komponenten des Zytoskeletts oder anderen Proteinen der postsynaptischen Membran interagieren, zu identifizieren. Das Zwei-Hybrid System in Hefe wurde mit molekularen Ködersequenzen von den intrazellulären  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 3$  Regionen angewandt. Alle bisher isolierten Klone waren jedoch Falsch-Positive. Ein alternativer Ansatz zur Identifikation von neuen Proteinen, die mit GABA<sub>A</sub> Rezeptoren interagieren könnten, bestand in einer Datenbanksuche, um Proteine zu identifizieren, die homolog zu GABARAP sind. Zwei neue, in der Maus exprimierte Sequenzen, mD und mF, kodierte Proteine, die zu 89.7%, beziehungsweise 59.0% identisch mit GABARAP sind. Insofern sind diese Proteine möglicherweise involviert in der Membranverankerung oder postsynaptischen Lokalisierung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren. Analyse der RNA von GABARAP, mD, mF und dem weiter entfernt verwandten Protein der leichten Kette 3

der an Mikrotubuli assoziierten Proteine 1A und 1B zeigte, dass alle vier Gene reichhaltig in allen analysierten Geweben der Maus, inklusive dem Gehirn, exprimiert werden. Für mD und mF spezifische Antiseren wurden als Werkzeuge hergestellt, um deren Interaktion mit GABA<sub>A</sub> Rezeptoren biochemisch und immunhistochemisch zu untersuchen. Auf Proteinebene zeigten sie spezifische Signale in Gesamtzellextrakt (Maushirn) und Membranpräparation (Rattenhirn). Diese Reagentien werden als wertvolle Werkzeuge für eine weitere Charakterisierung dieser Proteine und der Analyse ihrer möglichen Rolle als Verankerungsproteine des GABA<sub>A</sub> Rezeptors dienen.

## 2. Summary

GABA<sub>A</sub> receptors are members of the ligand-gated ion channel super gene family. Structurally, they represent hetero-pentameric complexes whose subunits share a common proposed membrane topology. Each subunit consists of a large N-terminal extracellular domain and four transmembrane domains with an extended intracellular loop region between transmembrane domain three and four. Differential expression and assembly of subunits gives rise to a large number of distinct receptor subtypes which differ, most notably, in the pharmacology of the receptor-associated benzodiazepine binding site. Moreover, specific anchoring mechanisms appear to play a role in differential subcellular localization of different receptor subtypes. Most receptor subtypes consist of variant  $\alpha$  and  $\beta$  subunits together with the  $\gamma 2$  subunit. The receptor subtypes containing the  $\gamma 2$  subunit are found concentrated at postsynaptic sites, where they are colocalized with gephyrin, a putative linker protein of GABA<sub>A</sub> receptors and the cytoskeleton. Other putative anchoring proteins include GABARAP, a microtubule-associated protein identified by means of its interaction with the  $\gamma 2$  subunit intracellular loop region. Interestingly, the  $\gamma 2$  subunit exists in two alternatively spliced forms,  $\gamma 2S$  and  $\gamma 2L$ , which differ by an eight amino acid exon located downstream of the GABARAP binding site. This part of the  $\gamma 2$  subunit may contribute significantly to the cytoplasmic surface of GABA<sub>A</sub> receptors but the functional significance of the alternatively spliced region is so far not known. The  $\gamma 1$  and  $\gamma 3$  subunits are structurally and functionally closely related to the  $\gamma 2$  subunit when analyzed *in vitro*. However their role *in vivo* is poorly understood.

Mice that lack a functional  $\gamma 2$  subunit gene express almost normal numbers of GABA<sub>A</sub> receptors that are, however, functionally impaired. The deficits include (i) lack of modulation by benzodiazepines (BZ), (ii) reduced channel conductance, (iii) failure to cluster at postsynaptic sites, and (iv) impaired subsynaptic membrane specialization, as indicated by the loss of postsynaptic gephyrin clusters. The regional expression of the endogenous  $\gamma 1$  and  $\gamma 3$  subunits appears unaltered in  $\gamma 2$  subunit-deficient mice and they do not seem to substitute for the lack of  $\gamma 2$  subunit function *in vivo*.

As part of the present doctoral theses we analyzed whether ectopic overexpression of either the  $\gamma 2S$ ,  $\gamma 2L$  or  $\gamma 3$  subunit could, in principle, substitute for the various functions of the endogenous  $\gamma 2$  subunit gene *in vivo*. Of particular interest was whether transgene-mediated ectopic overexpression of these subunits could substitute for the lack of

postsynaptic clustering and synaptic function observed in  $\gamma 2$  subunit-deficient neurons. Towards this end, transgenic mice that overexpress either the  $\gamma 2S$ ,  $\gamma 2L$  or  $\gamma 3$  subunit were generated and analyzed in a  $\gamma 2$  subunit-deficient genetic background ( $\gamma 2S^{tg}/\gamma 2^{0/0}$ ,  $\gamma 2L^{tg}/\gamma 2^{0/0}$  or  $\gamma 3^{tg}/\gamma 2^{0/0}$ ). The transgenic mice that overexpress either the  $\gamma 2S$  or the  $\gamma 2L$  subunit in a  $\gamma 2$  subunit-deficient background were phenotypically normal and clustering and postsynaptic targeting of GABA<sub>A</sub> receptors was restored to wild-type levels. Overexpression of the  $\gamma 3$  subunit in  $\gamma 2$  subunit-deficient mice restored benzodiazepine binding sites, benzodiazepine-modulated whole cell currents, and postsynaptic miniature currents, suggesting the formation of functional, postsynaptic receptors. Moreover, the  $\gamma 3$  subunit can substitute for  $\gamma 2$  in the formation of GABA<sub>A</sub> receptors that are clustered and colocalized with gephyrin *in vivo*. The properties of these ectopic  $\gamma 3$  subunit-containing receptors were subsequently found to also apply to native  $\gamma 3$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors. Nevertheless,  $\gamma 3^{tg}/\gamma 2^{0/0}$  mice suffered from early postnatal lethality, similar to  $\gamma 2^{0/0}$  mice.

Clustering and subcellular localization of GABA<sub>A</sub> receptors is believed to be mediated, at least in part, through interaction with specific proteins that link the receptors to the subsynaptic cytoskeleton. Therefore, a second aim included the identification of putative proteins that interact with GABA<sub>A</sub> receptor subunits and components of the cytoskeleton or other protein of the postsynaptic membrane. A yeast two-hybrid screen was performed with molecular baits derived from the  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  and  $\gamma 2$  intracellular loop regions. However, all clones isolated so far were false positives. As an alternative approach to identify novel proteins that might interact with GABA<sub>A</sub> receptors, a data base search was performed in order to identify proteins that are homologous to GABARAP. Two novel murine expressed sequence tags, mD and mF, encoded proteins that were 89.7% and 59.0% identical to GABARAP, respectively. Thus, these proteins are potentially involved in membrane anchoring or postsynaptic localization of GABA<sub>A</sub> receptors. RNase protection analyses of GABARAP, mD, mF and the more distantly related light chain 3 of microtubule associated proteins 1A and 1B indicated that all four genes are abundantly expressed in all tissues of the mouse analyzed, including brain. Antisera specific for mD and mF were prepared as tools to study their interaction with GABA<sub>A</sub> receptors biochemically and immunohistochemically. In Western blots they showed specific signals in whole cell extract (mouse brain) and membrane preparation (rat brain). These reagents will serve as valuable tools for the further characterization of these proteins and to assess their potential role as GABA<sub>A</sub> receptor anchoring proteins.