

Functional regulation of GABA_A receptors by CHOP, an associated protein

Doctoral Thesis

Author(s):

Sauter, Kathrin

Publication date:

2004

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004847985>

Rights / license:

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

**Functional regulation of GABA_B receptors by CHOP,
an associated protein**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Kathrin Sauter

Dipl. Biol. University of Zurich

Born July 14th, 1970

citizen of Ermatingen, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Möhler, examiner

Dr. D. Benke, co-examiner

Zusammenfassung

GABA_B-Rezeptoren sind heterodimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche die langsame Komponente der inhibitorischen GABAergen Neurotransmission im ZNS vermitteln. Der GABA_B-Rezeptor gilt als vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung von Pharmaka zur Therapie diverser pathophysiologischer Zustände wie z. B. Spasmen, Epilepsie, Suchtverhalten und Schmerz. Derzeit ist die strukturelle Basis für die Heterogenität von GABA_B-Rezeptorsubtypen, für das Domänenspezifische 'Targeting' von GABA_B-Rezeptorsubtypen sowie die Regulation der Anzahl von Rezeptoren in der Plasmamembran weitgehend unbekannt. Interessanterweise wurde der Transkriptionsfaktor CHOP mit dem 'Yeast Two-Hybrid' System als ein Protein identifiziert, welches möglicherweise mit GABA_B-Rezeptoren interagiert. CHOP ist ein besonders attraktiver Kandidat für ein GABA_B-Rezeptor interagierendes Protein, da er möglicherweise auf einen neuen, G-Protein unabhängigen Signaltransduktions-Weg des GABA_B-Rezeptors hindeutet. Daher war das Ziel der vorliegenden Studie, die potenzielle Interaktion von CHOP mit GABA_B-Rezeptoren aufzuklären.

- 1) Analyse der Interaktion von CHOP mit GABA_B-Rezeptoren in einem eukaryotischen Expressionssystem durch Doppelmakierung-Immuncytochemie und Immunpräzipitations-Experimente: Die Koexpression von CHOP mit der GABA_{B2}-Untereinheit führte zu einer Umverteilung von CHOP vom Zellkern ins Zytoplasma und an die Zellmembran, wo CHOP mit der GABA_{B2}-Untereinheit kolokalisierte. Die physische Interaktion von CHOP mit GABA_B-Rezeptoren wurde durch Koimmunpräzipitation bestätigt.
- 2) Identifikation der Interaktionsdomäne des GABA_B-Rezeptors und von CHOP: Mit Hilfe von Mutanten des GABA_B-Rezeptors und von CHOP konnten die Leuzin-Zipper-Sequenzen in den C-terminalen Domänen der GABA_{B2}-Untereinheit und von CHOP als Interaktionsstelle identifiziert werden. Interessanterweise interagiert CHOP auch mit der GABA_{B1a}-Untereinheit, nicht aber mit der GABA_{B1b}-Untereinheit, über eine noch nicht identifizierte Domäne.
- 3) Interaktion von CHOP mit heterodimeren GABA_B-Rezeptoren: Die Koexpression von CHOP mit heterodimeren GABA_{B1a}/GABA_{B2}-Rezeptoren in HEK 293 Zellen ergab eine dramatische Beeinflussung der subzellulären Verteilung der Rezeptoren. CHOP reduzierte weitgehend die Zell-Oberflächenexpression der GABA_B-Rezeptoren und bewirkte deren intrazelluläre Akkumulation. Dieser Effekt

war Rezeptorsubtyp-spezifisch, da nur GABA_{B1a}/GABA_{B2}-Rezeptoren, nicht aber GABA_{B1b}/GABA_{B2}-Rezeptoren betroffen waren. Dieses 'Mistargeting' wurde offensichtlich durch eine transiente Interaktion von CHOP mit den GABA_B-Rezeptoren vermittelt, da die Koexpression von GABA_{B1a}/GABA_{B2}-Rezeptoren mit einer Leuzin-Zipper-Deletionsmutante von CHOP, welche nicht an die GABA_{B2}-Untereinheit binden kann, zu einer normalen Zell-Oberflächenexpression der Rezeptoren führte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CHOP die GABA_{B1a}/GABA_{B2}-Rezeptoren destabilisieren und eine Agonisten-unabhängige Internalisierung der GABA_{B1a}/GABA_{B2}-Rezeptoren bewirken kann.

- 4) Kolokalisation von CHOP und GABA_B-Rezeptoren in Neuronen: In kultivierten hippocampalen und corticalen Neuronen zeigten die GABA_B-Rezeptoren eine diffuse Expression sowohl im Soma als auch in den Neuriten. Dieses Verteilungsmuster weist auf einen bedeutenden intrazellulären Pool von GABA_B-Rezeptoren hin. Eine Kolokalisation von GABA_B-Rezeptoren und CHOP war in grossen prominenten 'Patches' zu finden, die aufgrund ihrer Sensitivität auf β -methyl-Cyclodextrin als 'Lipid rafts' identifiziert wurden. Überraschenderweise wurde nach der Behandlung der Neuronen mit β -methyl-Cyclodextrin eine verstärkte Lokalisation von CHOP und GABA_B-Rezeptoren in Synapsen festgestellt, welches auf eine Rekrutierung von CHOP und GABA_B-Rezeptoren von den Lipid rafts in Synapsen hindeutet. Die physiologischen Auslöser, welche die Umverteilung von CHOP und GABA_B-Rezeptoren induzieren, müssen noch identifiziert werden.
- 5) Einfluss von CHOP auf die Agonisten-induzierte Internalisierung von GABA_B-Rezeptoren: Es zeigte sich, dass GABA_B-Rezeptoren nach Stimulation mit Baclofen den klassischen Endozytose-Pathway - vom Endosom zum Lysosom - durchlaufen. Die Koexpression von GABA_{B1b}/GABA_{B2}-Rezeptoren mit CHOP resultierte in einer beschleunigten Agonisten-induzierten Internalisierung der Rezeptoren sowie in einer Umverteilung von CHOP vom Zytoplasma in den Zellkern.

Die vorliegende Studie ergab, dass CHOP mit GABA_B-Rezeptoren in einer Rezeptorsubtyp-selektiven Weise interagiert und die Funktion, Stabilität sowie Verteilung der GABA_B-Rezeptoren beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass GABA_B-Rezeptoren zusätzlich zur Regulation von G-Proteinen, über andere Signaltransduktionswege mit Zellkomponenten kommunizieren.

Summary

GABA_B receptors are heterodimeric G-protein coupled receptors that mediate the slow GABAergic inhibitory neurotransmission in the CNS. GABA_B receptors are considered to be of major pharmacological relevance in the control of spasticity, epilepsy, the enhancement of antidepressant drug action, the suppression of cocaine withdrawal symptoms and the alleviation of pain. To date, the structural basis for the pharmacological heterogeneity of GABA_B receptors, the mechanism leading to the differential targeting and anchoring of GABA_B receptor subtypes to specific synaptic and extrasynaptic sites as well as the regulation of the cell surface number of GABA_B receptors is unknown. Most interestingly, the transcription factor CHOP was identified as a potential interacting protein using the yeast two-hybrid system. The transcription factor CHOP was an especially attractive candidate for receptor interaction since it suggested that GABA_B receptors may signal through a novel G-protein independent effector pathway. Therefore, the aim of the present study was a detailed analysis of the putative interaction of CHOP with GABA_B receptors.

- 1) Investigation of the interaction of CHOP with GABA_B receptors upon coexpression in HEK 293 cells by double labeling immunocytochemistry and immunoprecipitation studies: In HEK 293 cells, coexpression of CHOP and GABA_{B2} resulted in a redistribution of CHOP from the nucleus to cytoplasmic sites and the plasma membrane, where CHOP colocalized with GABA_{B2}. Co-immunoprecipitation of CHOP and GABA_B receptors from transfected HEK 293 cells and from brain extracts demonstrated a physical association of both proteins.
- 2) Identification of the interaction domain of CHOP and GABA_B receptors: Mutational analysis revealed that CHOP and GABA_{B2} interact via the leucine zippers present in their C-terminal domains. In addition, CHOP was found to interact also with GABA_{B1a} via a yet unknown site but not with GABA_{B1b}.
- 3) Interaction of CHOP with heterodimeric GABA_B receptors expressed in HEK 293 cells: Upon coexpression of CHOP with heteromeric GABA_B receptors, a dramatic redistribution or 'mistargeting' of GABA_{B1a}/GABA_{B2} receptors was observed. Interestingly, no redistribution was detected upon coexpression of CHOP with GABA_{B1b}/GABA_{B2} receptors indicating that the mistargeting induced by CHOP is depending on the receptor subtype. Mistargeting of GABA_{B1a}/GABA_{B2} receptors was due to an apparently transient interaction of GABA_B receptors with CHOP

since coexpression of GABA_{B1a} and GABA_{B2} with CHOP lacking its leucine zipper rescued heterodimeric GABA_{B1a}/GABA_{B2} receptors from mistargeting. Thus, CHOP may destabilize the GABA_{B1a}/GABA_{B2} receptor complex, which finally leads to an agonist-independent internalization of GABA_{B1a}/GABA_{B2} receptors.

- 4) Colocalization of CHOP with GABA_B receptors in neurons: In primary cultured neurons GABA_B receptors exhibited a diffuse expression pattern throughout the entire soma and neurites of the neurons. This pattern of distribution suggests that a significant portion of GABA_B receptors was not localized to the plasma membrane but resided in intracellular pools. CHOP was found to be preferentially colocalized with GABA_B receptors in large patches that were identified as lipid rafts. Upon treatment with β -methyl cyclodextrin, which destroys lipid rafts, both CHOP and the GABA_B receptors were redistributed from the lipid rafts into synapses. However, physiological stimuli that induce the redistribution of GABA_B receptors and CHOP remain to be identified.
- 5) Influence of CHOP on the agonist-induced internalization of GABA_B receptors: GABA_B receptors were found to be rapidly internalized upon baclofen stimulation and sorted to the lysosomal degradation pathway. Coexpression of GABA_{B1b}/GABA_{B2} receptors with CHOP resulted in an acceleration of agonist-induced internalization and in a redistribution of CHOP from the cytoplasm to the nucleus.

In conclusion, the present study revealed that CHOP interacts with GABA_B receptors in a subtype-selective manner and can influence the function, distribution and stability of GABA_B receptors. These results demonstrate that GABA_B receptors communicate with cellular components by a signal transduction pathway other than that used for G proteins.