

Abstract

The mammalian protein gephyrin consists of three major domains, all of which being required for clustering of inhibitory glycine and γ -amino butyric acid type A (GABA_A) receptors at postsynaptic sites. While the N-terminal G-domain forms trimers within the protein, the C-terminal E-domain binds cytoplasmic loops of both types of receptors. The central C-domain is believed to have a key function in controlling gephyrin function via post-translational regulation and conformational changes. Furthermore, the C-domain is the major target to alternative splicing with at least five cassettes leading to a broad spectrum of gephyrin isoforms.

In the current study, novel gephyrin interaction partners that bind to different isolated C-domain splice variants were identified by quantitative mass spectrometry. Following cosedimentation of gephyrin interaction partners from mouse brain lysates using intein-tagged C-domain, enriched proteins were labeled with tandem mass tags (TMT) and quantitatively identified by LC-MS/MS in comparison to controls. In complementary approach, proteins were directly identified by label-free LC-MS/MS and compared to TMT-based labeling.

Although splice-specific interacting-partners were not identified, a total of 60 potential gephyrin interacting proteins were found by the TMT-based method of which many were already known interactors. Identified proteins were grouped into classes such as cytoskeleton and cytoskeleton binding and regulatory proteins (e.g. actin, spectrin, tubulin, profilin) or regulatory proteins (e.g. serine/threonine phosphatase 2A, calcium/calmodulin dependent protein kinase type II, 14-3-3 proteins).

Two of the newly identified interaction partners of gephyrin were confirmed and characterized in detail: peptidyl-prolyl cis/trans isomerase A (PPIase A) and serine/threonine protein phosphatase 2B (calcineurin), which directly interact with each other and link gephyrin to signaling pathways in nervous system development and function. Both proteins could be shown to bind to the poly-proline motif of the gephyrin C-domain using specific crosslinking, co-immunoprecipitation and colocalization experiments in COS7 cells. Calcineurin was demonstrated to dephosphorylate Threonine 198 and Serine 305 within the C-domain of Sf9 gephyrin *in vitro* and the physiological relevance of calcineurin and PPIase A for gephyrin clustering in primary hippocampal neurons was investigated. Overexpression of both proteins affected endogenous gephyrin clustering, while the inhibition of PPIase A activity had no effect on gephyrin interaction or the synaptic targeting of gephyrin. These results might suggest that PPIase A has an indirect effect on gephyrin clustering by regulating the activity of calcineurin. Finally, the deletion of the poly-proline motif within the gephyrin C-domain was shown to cause a diffuse distribution of gephyrin in COS7 cells and to reduce gephyrin cluster size in primary hippocampal neurons, whereas folding and catalytic activity of gephyrin remained unaffected. These results indicate that the poly-proline region has an important function in gephyrin oligomerization and clustering, which is potentially mediated by the binding of PPIase A and calcineurin.

Zusammenfassung

Das Säugetier-Protein Gephyrin besteht aus drei Domänen, welche entscheidende Funktionen für die Clusterung von inhibitorischen Glycin- und γ -Aminobuttersäure-Typ A (GABA_A)-Rezeptoren an der Postsynapse übernehmen. Dabei bildet die N-terminale G-Domäne eine trimere Achse innerhalb des Proteins aus, während die C-terminale E-Domäne zytoplasmatische Loops beider Rezeptortypen bindet. Die zentrale Gephyrin C-Domäne übernimmt vermutlich Schlüsselfunktionen in der neuronalen Gephyrin-Funktion, die durch verschiedene Formen posttranslationaler Modifikationen kontrolliert wird und mit konformationellen Änderungen assoziiert ist. Darüber hinaus unterliegt die C-Domäne alternativen Spleiß-Vorgängen, wobei mindestens fünf verschiedene Kassetten für ein breites Spektrum an Gephyrin-Isoformen sorgen.

In dieser Arbeit wurden neue Gephyrin-Interaktionspartner, die an verschiedene C-Domäne Spleiß-Varianten binden, über quantitative Massenspektrometrie identifiziert. Dazu wurden zunächst Interaktionspartner an Intein-gekoppelte Spleiß-Varianten der Gephyrin C-Domäne aus *Maushirnextarkt* gebunden, mit *Tandem Mass Tags* (TMT) markiert und anschließend über LC-MS/MS im Vergleich zu Kontrollen identifiziert und quantifiziert. In einer alternativen und vergleichenden Strategie wurden die angereicherten Proteine über eine Label-freie LC-MS/MS-Analyse identifiziert und quantifiziert.

Obwohl keine spleiß-spezifischen Interaktionspartner identifiziert werden konnten, wurden insgesamt 60 potentielle Interaktionspartner der Gephyrin C-Domäne über die TMT-basierte Methode gefunden, wobei eine Vielzahl dieser Proteine bereits bekannte Gephyrin-Interaktionspartner darstellen. Die identifizierten Proteine konnten dabei in verschiedene Funktionskategorien wie Zytoskelett bzw. Zytoskelett-bindende oder –regulierende Proteine (z.B. Aktin, Spectin, Tubulin, Profilin) oder regulatorische Proteine (z.B. Serin/Threonin Protein-Phosphatase 2A, Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase Typ II, 14-3-3 Proteine) eingeteilt werden.

Zwei der identifizierten Interaktionspartner, Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase A (PPIase A) und Serin/Threonin Protein-Phosphatase 2B (Calcineurin), wurden näher charakterisiert. Beide Proteine interagieren miteinander und verknüpfen Gephyrin mit neuronalen Signalwegen. Über spezifische Quervernetzung, Koimmunpräzipitation sowie Kolokalisationsstudien in COS7-Zellen konnte jeweils die Bindung beider Proteine im Polyprolin-Motiv der Gephyrin C-Domäne gezeigt und charakterisiert werden. Calcineurin dephosphoryliert dabei Threonin 198 und Serin 305 der C-Domäne von Sf9 Gephyrin *in vitro* und es konnte eine physiologische Relevanz von Calcineurin und PPIase A für die Clusterung von Gephyrin in primären hippocampalen Mausneuronen gezeigt werden. Die Überexpression beider Proteine beeinflusste dabei die Clusterung von endogenem Gephyrin, während die Inhibition der PPIase A-Aktivität keinen Effekt auf die Interaktion mit Gephyrin oder auf dessen synaptische Rekrutierung verursachte. Dies deutet einen indirekten Einfluss der PPIase A auf die Gephyrin-Clusterung an, welcher möglicherweise über die Regulation der Calcineurin-Aktivität erfolgt. Die Deletion des Polyprolin-Motivs der Gephyrin C-Domäne verursachte eine diffuse Verteilung von Gephyrin in COS7-Zellen und verringerte die Größe der Gephyrin-Cluster in primären hippocampalen Neuronen, während die Faltung und die katalytische Aktivität des Proteins unbeeinflusst blieben. Die Polyprolinregion übernimmt daher wichtige Funktionen für die Oligomerisierung und Clusterung von Gephyrin, welche möglicherweise über die Bindung von PPIase A und Calcineurin reguliert wird.

