

VU Research Portal

Characterization of the Shisa family of potential AMPA receptor modulatory proteins

Karataeva, A.R.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Karataeva, A. R. (2014). *Characterization of the Shisa family of potential AMPA receptor modulatory proteins*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Achtergrond informatie

Signaaloverdracht tussen zenuwcellen verloopt via gespecialiseerde structuren, genaamd synapsen. Deze synapsen vertalen een elektrisch signaal, dat binnenkomt vanuit de zendende cel, naar een chemische boodschap voor de ontvangende cel, in de vorm van uitgescheiden neurotransmitters. Deze neurotransmitters binden en activeren receptoren in het membraan van de ontvangende cel, waarop deze elektrisch gestimuleerd dan wel onderdrukt wordt. De meest prominente stimulerende receptor binnen ons zenuwstelsel is de α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, oftewel de AMPA receptor, welke geactiveerd wordt na binding van glutamaat. AMPA receptoren zijn tetramere complexen die worden samengesteld uit een viertal subunits, GluA1-4. Hierbij zijn de combinaties van twee GluA2 subunits met twee GluA1 subunits, dan wel met twee GluA3 subunits, het meest voorkomend.

De hoeveelheid, verdeling, mobiliteit en kanaaleigenschappen van AMPA receptoren zijn in hoge mate bepalend voor het profiel van een synaptische verbinding, en deze variabelen staan dan ook onder stricte, dynamische regulatie. Zo kunnen de AMPA receptor subunits zelf verscheidene aanpassingen ondergaan, waaronder RNA splicing, RNA editing, fosforylatie en ubiquitinatie. Een tweede, en wellicht nog belangrijkere vorm van AMPA receptor regulatie, verloopt via de directe interactie met zogenaamde AMPA receptor auxiliary subunits. Deze klasse van receptor-geassocieerde eiwitten vervult een sturende rol in vrijwel de gehele levenscyclus van de receptor; van het transport naar de synaps, tot de verankering in de postsynaptische dichtheid en de verfijnde afstelling van de ionkanaal kinetiek. De meest bestudeerde AMPA receptor auxiliary subunits zijn de TARP en Cornichon eiwitten, maar hiertoe beperkt de groep zich niet. In 2010 publiceerde von Engelhardt *et al*, in samenwerking met ons lab, de ontdekking van een nieuwe AMPA receptor auxiliary subunit, genaamd CKAMP44/ Shisa9. Dit Shisa9 eiwit blijkt een belangrijke rol te vervullen in de synaptische communicatie en plasticiteit binnen het gyrus dentatus gebied van de hippocampus. Hoewel de functionele rol van Shisa9 hiermee gedeeltelijk in kaart is gebracht, blijft de vraag bestaan of Shisa9 naast de AMPA receptor ook nog andere eiwitten kan binden. Zo ja, wat dan de rol van deze interacties is binnen de Shisa9 gestuurde AMPA receptor regulatie.

Spoedig na de identificatie van Shisa9 als AMPA receptor auxiliary subunit bleek dat er een uitgebreide familie van Shisa eiwitten bestaat, met tot op heden acht geïdentificeerde leden in het muis genoom. Alle Shisa eiwitten zijn type-I transmembraan eiwitten, en allen bevatten een kenmerkende cysteine-rijke structuur binnen hun extracellulaire domein. Met name de nog onbekende Shisa6 en Shisa7 eiwitten vertonen aanzienlijke structurele overeenkomsten met Shisa9.

In dit proefschrift omschrijf ik de experimenten die zijn ondernomen om de intracellulaire bindingspartners van Shisa6, -7 en -9 in kaart te brengen. Hiernaast heb ik met verscheidene methoden het functionele belang van deze interacties onderzocht.

Hoofdstuk 2. De C-terminale interactoren van de AMPA receptor auxiliary subunit Shisa9

In dit hoofdstuk hebben we de intracellulaire bindingspartners van Shisa9 in kaart gebracht middels het uitvoeren van een yeast two-hybrid screening. Hierbij lag onze interesse met name bij acht geïdentificeerde eiwitten die een PDZ-domein bevatten, aangezien het hieraan bindend motief (EVTV) een prominent onderdeel uitmaakt van Shisa9. PDZ-domein eiwitten kennen veelal een structurele functie binnen de postsynaptische dichtheid, en de verankering hieraan zou een belangrijke rol kunnen spelen in de mobiliteitsregulatie van het Shisa9-AMPA receptor complex. Om het functionele belang van de Shisa9-PDZ-domein eiwit interactie te onderzoeken hebben we deze verstoord middels de toevoeging van een concurrerend peptide. Deze verstoring leidde tot een duidelijke verandering in de kanaaleigenschappen van de AMPA receptor en ook tot veranderingen in de hippocampale netwerkactiviteit. C-terminale interacties van Shisa9 zijn dus van belang voor kanaalfunctie en neuronale netwerkactiviteit.

Hoofdstuk 3. Het interactoom van het cytoplasma domein van Shisa6 – Een AMPA receptor auxiliary subunit

Na Shisa9 is ook Shisa6 recentelijk bevestigd een AMPA receptor auxiliary subunit te zijn. Naast de duidelijke overeenkomsten tussen de twee familieleden, zijn er ook aanzienlijke verschillen. Zo komt Shisa6 in de gehele hippocampus tot expressie, en maakt het onderdeel uit van cerebellaire Purkinje cellen. Op het structurele vlak kent Shisa6 een groter intracellulair domein met onder meer een SH3-domein bindend motief. Mijn doelstelling in dit hoofdstuk was het bestuderen van het Shisa6 intracellulaire interactoom middels het uitvoeren van een yeast two-hybrid screen. Binnen deze screen zijn 262 potentiële Shisa6 interactoren geïdentificeerd, waarvan 16 eiwitten met een PDZ of SH3 domein. Van deze 16 interactoren heb ik vervolgens bepaald via welk deel van Shisa6 hun binding verloopt, waarbij de essentiële rol van de PDZ en SH3 domein bindende motieven werd bevestigd. Ter afsluiting heb ik een vergelijking gemaakt tussen de yeast two-hybrid resultaten, en een Shisa6 interactoom dat was verkregen via immunoprecipitatie experimenten op hippocampaal weefsel van de muis. Vijf van de Shisa6 interactoren konden via beide methoden worden geïdentificeerd.

Hoofdstuk 4. Een yeast two-hybrid screen met het intracellulaire domein van Shisa7 – Een vergelijking tussen het interactoom van Shisa6 en Shisa7

Shisa7 komt tot expressie in verschillende delen van brein, waaronder de hippocampus en de cortex, en vertoont grote structurele overeenkomsten met Shisa6 en Shisa9. Het is tot op heden echter onbekend of Shisa7 eveneens als AMPA receptor auxiliary subunit functioneert. In dit hoofdstuk gebruik ik de succesvolle yeast two-hybrid strategie om de intracellulaire bindingspartners van Shisa7 te identificeren. Vervolgens maak ik een uitgebreid vergelijk tussen de interactomen van Shisa6 en Shisa7.

Hoofdstuk 5. De mogelijke rol van Shisa6 en Shisa7 binnen AMPA receptor ubiquitinatie

Het transport van AMPA receptoren speelt een belangrijke rol bij het aanpassen van de sterkte van een synaptische verbinding, en dit proces dient dan ook goed gereguleerd te worden. Recent onderzoek heeft aangetoond dat de ubiquitinatie van de GluA1 subunit van de AMPA receptor, door het E3-ubiquitine ligase NEDD4, leidt tot receptor internalisatie. De details van dit proces zijn tot op heden echter onbekend. In dit hoofdstuk laat ik zien dat Shisa6 en Shisa7 beide in staat zijn om NEDD4 op een directe wijze te binden, en dat deze interactie ook in hippocampale eiwit complexen kan worden waargenomen. We stellen dan ook een model voor waarbinnen Shisa6 en Shisa7 de interactie tussen NEDD4 en de AMPA receptor op een structurele wijze faciliteren.

Conclusie

In dit proefschrift toon ik aan dat Shisa9 een verbinding aangaat met verscheidene PDZ-domein bevattende eiwitten, en dat deze koppeling van essentieel belang is voor het correct functioneren van hippocampale glutamaterge synapsen. Verder laat ik zien dat zowel Shisa6 en Shisa7 een uitgebreid intracellulair interactoom kennen, dat gedeeltelijk overlapt, maar wezenlijk verschillend is van het interactoom van Shisa9. Afsluitend stel ik een model voor waarbij Shisa6 en -7 een belangrijke rol spelen in de regulatie van AMPA receptor ubiquitinatie.