

VU Research Portal

C2 Domain Function in Healthy and Diseased Brain

Giniatullina, A.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Giniatullina, A. (2015). *C2 Domain Function in Healthy and Diseased Brain*. [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

Nederlandse Samenvatting

Stel je de complexiteit voor van neuronale processen die betrokken zijn bij het zeggen van de juiste dingen op het juiste moment. Beoordeling van de situatie, herinneren eerdere relevante ervaringen, het inschatten van het effect dat de woorden zullen produceren op de luisteraar, het aanpassen van de toon, volume en de gezichtsuitdrukking om de beoogde boodschap over te brengen. Weten wanneer je moet beginnen te praten. Wij kunnen dit allemaal, meestal in minder dan een seconde. Het werk de motorkap is snel, reproduceerbaar en naadloos (in de meeste gevallen).

Als we kijken naar de processen die betrokken zijn bij hersen functies, is de complexiteit hiervan indrukwekkend, zelfs op het basisniveau van het vrijgeven van een bepaalde hoeveelheid neurotransmitter op de juiste tijd en locatie. Eén van de fundamentele instrumenten die neuronen gebruiken om hun activiteit te reguleren is gebaseerd op calcium signalen, en er zijn veel verschillende eiwitten betrokken bij het meten en vertalen deze boodschap.

Meerdere eiwitten vertalen het lokale niveau van calcium in membraanfusie. Dubbele C2-domein eiwitten uit Synaptotagmin- en Doc2 eiwitfamilies spelen een belangrijke rol bij de koppeling van het calcium signaal met het afgeven van synaptische blaasjes. Hun activiteit hangt af van factoren zoals de precieze calcium niveaus in de presynaptische terminal en de lipide samenstelling van het celmembraan.

C2-domeinen werden als eerste beschreven in 1980 als calcium-afhankelijke verbindingen met zure fosfolipiden, en de eerste kristalstructuur van een C2-domein werd verkregen in de jaren '90. Laboratoria over de hele wereld hebben de afgelopen 30 jaar gewerkt aan C2-domein eiwitten, met name aan synaptotagmin-1. Als je op PubMed naar "C2 domein" zoekt, komen er meer dan 1000 publicaties, en meer dan 2000 resultaten voor "synaptotagmin".

Toch hebben we nog veel te leren over de functie en regulatie van C2-domeinen, en hun gemeenschappelijke kenmerken. Identificatie van de "gemeenschappelijke regels" in de eigenschappen en het gedrag van C2-domeinen zal de toekomstige karakterisering van C2 domeinfunctie versnellen, en zal helpen bij het voorspellen van de impact van patiënten-mutaties op de pathogenese. Zo weten we precies welke aminozuren verantwoordelijk zijn voor het directe contact met calciumionen in synaptotagmin-1 en Doc2b, en dit helpt ons met het voorspellen van calciumbindende residuen in homologe C2 domeinen, en de identificatie van mutanten met defecte calcium binding.

In het werk beschreven in dit proefschrift, hebben we geprobeerd om de gemeenschappelijke eigenschappen van C2 domeinen te benutten om drie verschillende eiwitten te bestuderen: Piccolo, Doc2b en CC2D2A. We hebben ook gebruik gemaakt synaptotagmin-1 C2 domeinen als referentie voor het ontwikkelen van een C2 domein zuiveringsmethode. We hebben verschillende benaderingen gebruikt om C2 domeinen te bestuderen: enerzijds hebben we variaties in C2-domeinen door mutaties in overeenkomstige genen bij patiënten bestudeerd (hoofdstuk 2 en 4). Voor een ander perspectief gebruikten wij een biofysische instrument om C2 domein interactie met membranen te onderzoeken (hoofdstuk 3). Deze twee benaderingen kunnen in de toekomst worden gecombineerd om onze kennis van de C2-domeinen en hun rol in gezondheid en ziekte verder te verdiepen.

In hoofdstuk 2 beschrijven we het effect van een genetische variatie in het C2 domein van het gen Piccolo, dat is geassocieerd met depressieve stoornissen. We hebben een knock-in muismodel gemaakt dat de met depressie geassocieerde variant van Piccolo draagt, en deze vergeleken met een muis die de “gezonde” versie van hetzelfde gen heeft. We vonden dat de muizen met de depressie geassocieerde versie van Piccolo iets hogere hoeveelheden Piccolo eiwit in synapsen hadden, samen met een verhoogde vrijlating van neuronale blaasjes, maar dat de gedragsparameters van deze muizen waren.

In hoofdstuk 3 beschrijven we de ontwikkeling van een nieuwe methode om de interactie van C2 domeinen met fosfolipidmembranen te bestuderen. We gebruiken optische pincetten, die krachten meten op moleculair niveau, om te detecteren wat voor effect Doc2B C2 domeinen op membranen produceren. We hebben een experimenteel model gemaakt van cellulaire membranen, in een gecontroleerde omgeving waarin we de gewenste concentraties van calcium en C2-domeinen kunnen toevoegen, en tegelijkertijd ook de lipidsamenstelling van de membranen kunnen controleren. Deze werkwijze werd gecombineerd met gelijktijdige fluorescentie microscopie om niet alleen kracht te meten, maar ook tegelijkertijd de membraanconfiguratie te visualiseren. Dit liet ons toe om te zien en te meten dat de dubbele C2 domeinen van Doc2B hemifusie van fosfolipidmembranen induceren in aanwezigheid van calcium en hun specifieke lipide interactiepartner fosfatidylserine.

Van de eiwitten die in dit proefschrift onderzocht, onderscheidt CC2D2A zich (hoofdstuk 4), omdat het niet een gevestigd onderdeel van de presynaptische machinerie is. Er waren aanwijzingen dat CC2D2A belangrijk kon zijn voor de vorming en functie van cilia, maar er was heel weinig bekend over een mogelijk mechanisme. Er is niets bekend over de eigenschappen van het CC2D2A C2-domein, behalve dat

mutaties in het gen *CC2D2A* die resulteren in de deletie van het C2-domein gevonden zijn in patientien met ernstige neurologische stoornissen. We hebben cellulaire expressie van deletie-mutanten van *CC2D2A* en calcium-afhankelijke fosfolipide binding door het C2-domein bestudeerd. We konden de aanwezigheid van normale *CC2D2A* niet detecteren in de cilia in neuronen, maar vonden dat C2 domein deletie versies van *CC2D2A* instabiel waren en op zeer lage niveaus aanwezig zijn in in cellen.

Hoofdstuk 5 bevat een gedetailleerde beschrijving van de methoden voor de productie en zuivering van recombinante C2-domeinen, die onontbeerlijk zijn geweest voor alle projecten in dit proefschrift, vooral voor de zeer gevoelige krachtmetingen.