



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Diseases of the nervous system associated with calcium channelopathies**

Todorov, B.B.

### **Citation**

Todorov, B. B. (2010, June 2). *Diseases of the nervous system associated with calcium channelopathies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15580>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15580>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



SUMMARY  
SAMENVATTING  
LIST OF PUBLICATIONS  
CURRICULUM VITAE



## SUMMARY

Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VGCC) allow  $\text{Ca}^{2+}$  influx into excitable cells, which in neurons couples excitation to neurotransmitter release. VGCCs are large, multimeric, protein complexes consisting of a pore-forming  $\alpha_1$  subunit and accessory  $\beta$  and  $\alpha_2\delta$ , and in some cases  $\gamma$  subunits. No less than ten genes encode  $\alpha_1$  subunits, the dominant determinant of  $\text{Ca}_v$  channel subtypes. There are four  $\beta$ , three  $\alpha_2\delta$ , and eight  $\gamma$  subunits that are encoded by different genes and are associated with  $\alpha_1$  subunits in various combinations, thus ensuring a wide variety of  $\text{Ca}_v$  channels. The introduction of this thesis focuses primarily on the role of  $\text{Ca}_v2.1$  channels in relation to disease and how they contribute to “calcium channelopathies” (*Chapter 1*). Neuronal  $\text{Ca}_v2.1$  channels are abundantly expressed throughout the central nervous system (CNS), where they are crucial for fast neurotransmitter release. In the periphery (i.e., the peripheral nervous system; PNS), they are expressed in neurons of the neuromuscular junction (NMJ), mediating presynaptic acetylcholine (ACh) release. Mutations in  $\text{Ca}_v2.1$  channels are likely to affect neurotransmitter release, resulting in synaptic dysfunction.

One major disease that is associated with  $\text{Ca}_v2.1$  channel mutations is familial hemiplegic migraine type 1 (FHM1), a disease that can be associated with other neurological phenotypes, such as various types of epilepsy and permanent ataxia.  $\text{Ca}_v2.1$  channel mutations can also be found in patients with episodic ataxia type 2 (EA2) and in patients with late-onset spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). Several natural mouse mutants are available for the investigation of the consequences of mutant  $\text{Ca}_v2.1$  channel proteins. There are several mouse mutants with missense (e.g., *tottering*, *rolling Nagoya*, and *rocker*) or frame shift/deletion (i.e., *leaner*) mutations in the  $\text{Ca}_v2.1$ - $\alpha_{1A}$  subunit, which is encoded by the *Cacna1a* gene. *Lethargic* has a deletion mutation in the  $\beta_4$  (*Cacnab4* gene). Mouse mutant *ducky* has a null mutation in the  $\alpha_2\delta_2$  product of the *Cacna2d2* gene, and *stargazer* has a deleterious mutation in the  $\gamma_2$  protein (*Cacng2* gene). These mutants display striking overlapping neurological phenotypes of (severe) ataxia, stereotypic movement abnormalities, and in some cases epilepsy and even early lethality. Notably, electrophysiological and biochemical characterization of these natural mutant mice has shown that aberrant  $\text{Ca}_v2.1$  function can be compensated for by specific upregulation of *other* neuronal  $\text{Ca}_v$  channel types, depending on the neuronal cell type. However, a more detailed investigation of the cell-specific roles of  $\text{Ca}_v2.1$  channels is hampered by their wide expression in the CNS.

This thesis aimed to investigate specific research questions concerning the cell-specific roles of  $\text{Ca}_v2.1$  channels, primarily in relation to movement coordination, by generating and analyzing various existing and novel transgenic mouse models. To this end, the endogenous *Cacna1a* gene was modified using conditional *knockout* (KO) and *knockin* (KI) gene-targeting approaches. In addition, conventional transgenesis was applied to introduce copies of a mutated human *CACNA1A* cDNA in the mouse genome. It was envisaged that these models will help elucidate the role of  $\text{Ca}_v2.1$  channel function in



pathophysiological mechanisms of motor coordination, such as ataxia. The mice were investigated using a wide range of (neuro)biological research methods and provided insight on (ultra)structural, electrophysiological, and behavioural aspects of calcium channelopathies.

*Chapters 2 and 3* describe the consequences of mutations in Ca<sub>v</sub>2.1 channels (in natural mouse mutants and Ca<sub>v</sub>2.1- $\alpha_1$  KO mice) on neurotransmitter release in the NMJ, a well-studied single-neuron synapse in the PNS.

The electrophysiological response to ACh release was measured in *ducky*, *lethargic*, and *stargazer* mice that lack functional accessory subunits  $\alpha_2\delta_2$ ,  $\beta_4$ , or  $\gamma_2$ , respectively (*Chapter 2*). It was hypothesized that spontaneous and/or nerve stimulation-evoked neurotransmitter release may be affected in these mutants, because earlier *in vitro* whole-cell patch clamp recordings and biochemistry had revealed that the accessory subunits affect membrane expression (i.e.,  $\beta_4$ ) and specific biophysical properties (i.e.,  $\alpha_2\delta_2$  and  $\gamma_2$ ) of Ca<sub>v</sub>2.1 channels. No significant abnormalities were observed in *ex vivo* recordings of NMJs of *ducky*, *stargazer*, and *lethargic* mice. The implications are two-fold: either the lack of  $\alpha_2\delta_2$ ,  $\beta_4$ , and  $\gamma_2$  subunits at this motor nerve terminal is effectively compensated by other Ca<sub>v</sub> channel subunits (i.e., functional redundancy) or, unlike hints from literature, the  $\beta_4$ ,  $\alpha_2\delta_2$ , and  $\gamma_2$  do not play a role at this synapse.

Ablation of the  $\alpha_{1A}$  subunit in previously generated Ca<sub>v</sub>2.1 KO mice resulted in a ~50% reduction of spontaneous and evoked ACh release at the NMJ and a severe phenotype of dystonia, ataxia, and early postnatal lethality. To circumvent lethality and obtain a tool to investigate spatial and temporal ablation of Ca<sub>v</sub>2.1 channels in PNS and CNS neurons, we generated transgenic mice with a conditional, floxed, *Cacna1a* allele (*Chapter 3*). Floxed mice did not reveal an overt abnormality in behavior or overall brain cytoarchitecture. Also, the Ca<sub>v</sub>2.1 expression pattern and Ca<sub>v</sub>2.1-dependent neurotransmitter release at the NMJ did not seem to be affected. Crossing the floxed mice with EIIA-Cre deleter mice resulted in an ablation of Ca<sub>v</sub>2.1 channels in all nucleated cells and a severe phenotype identical to that seen in conventional Ca<sub>v</sub>2.1- $\alpha_{1A}$  KO mice. Lack of Ca<sub>v</sub>2.1 channel activity was shown by electrophysiological analysis of the NMJs of the mice.

Fine motor coordination is the result of delicate actions of the cerebellar circuitry, in which various neurons, such as inferior olivary, granule, and Purkinje cells play an important role. Defects in this system result in gait abnormalities (i.e., ataxia). Although Ca<sub>v</sub>2.1 channels are highly expressed throughout the cerebellum, it is at present unknown how important these channels are in the various cerebellar neurons. *Chapters 4, 5, and 6* focus on dissecting the cell-specific role of wild-type or mutant Ca<sub>v</sub>2.1 channels in motor coordination.

*Chapters 4 and 5* investigate the role of wild-type Ca<sub>v</sub>2.1 channels in two main cerebellar cell types in which Ca<sub>v</sub>2.1 is expressed: Purkinje cell and granule cell neurons. Cell-specific Ca<sub>v</sub>2.1 KO mice were generated by crossing floxed (conditional)





Ca<sub>v</sub>2.1 mice with transgenic mice that contain either a *Gaba<sub>A6</sub>*-driven or *L7/pcp-2*-driven *Cre-recombinase* transgene. Offspring of the former cross lacks Ca<sub>v</sub>2.1 channels in cerebellar granule cells, while mice of the latter cross do not have these channels in Purkinje cells. Ablation of Ca<sub>v</sub>2.1 channels in Purkinje cell neurons, but not granule cells, was shown to result in cerebellar ataxia. Cerebellar ataxia in Purkinje cell Ca<sub>v</sub>2.1-deficient mice was observed early in life when Purkinje cells are still present, and was aggravated by later massive Purkinje cell loss. Notably, while synaptic transmission at parallel fiber-Purkinje cell synapses in granule cell Ca<sub>v</sub>2.1-deficient mice was decimated, this led to only minor defects in motor behavior. These mutant mice were able to perform motor tasks without problems, while they failed in vestibulo-ocular reflex (VOR) learning paradigms. The mice were able to decrease their VOR gain, but seemed to quickly “forget” the learned compensatory eye movements. This pointed to a novel role of Ca<sub>v</sub>2.1 channels in granule cells - that is consolidating motor learning.

The studies described in *Chapter 6* tested whether permanent ataxia that is associated with certain FHM1 mutations is due to abnormal Ca<sub>v</sub>2.1 channel functioning in Purkinje cells. To this end, several mouse lines were generated by conventional transgenesis overexpressing the *T666M*-mutant  $\alpha_{1A}$  protein from a Purkinje cell-specific, *L7/pcp-2* promoter-driven, human *CACNA1A* cDNA construct. It was hypothesized that because of reported gain-of-function effects of FHM1 mutations at the single channel level, overexpression of the transgene may be sufficient to induce an ataxic phenotype in the mice. Assessment of cell types that express the transgene was possible because of the introduction of an EGFP reporter cDNA sequence that was separated from the *CACNA1A* sequence by an internal ribosome entry site (IRES) DNA sequence of an encephalomyocarditis virus (ECMV) mutant. As a consequence, mutant  $\alpha_{1A}$  protein and EGFP protein were co-translated from a single messenger molecule. Three transgenic lines showed expression of the reporter protein in Purkinje cells. Real-time PCR indicated that the expression level of the transgene was relatively low compared to that of endogenous *Cacna1a*. This may be one possible explanation why these transgenic mice did not show an abnormal motor phenotype.

*Chapter 7* presents the generation and detailed analysis of a novel knockin mouse strain carrying the FHM1 S218L mutation. S218L patients exhibit hemiplegic migraine, progressive ataxia, and an increased susceptibility to epilepsy and mild head trauma-induced edema. In line with the human phenotype, S218L KI mice showed mild permanent cerebellar ataxia that does not seem to be accompanied by muscle weakness (*Chapter 7*). In addition, S218L KI mice display a decreased survival, probably due to an increased susceptibility to have seizures. At the molecular level, S218L KI mice reveal increased Ca<sup>2+</sup> influx through cerebellar granule cell neurons and increased neurotransmitter release at the NMJ. S218L KI mice were also found to be more susceptible to cortical spreading depression (CSD), which is a slowly progressing wave of neuron and glial cell depolarisation that is a hallmark of the migraine aura. Notably, the consequences of the FHM1 S218L mutation on Ca<sup>2+</sup> influx, spontaneous



neurotransmitter release, as well as key aspects of CSD susceptibility were more pronounced than in previously generated KI mice that express the FHM1 R192Q mutation. The latter mice, in contrast to homozygous S218L KI mice, did not exhibit the behavioral phenotypes of cerebellar ataxia and epilepsy.

In *Chapter 8*, a more detailed morphological and electrophysiological analysis of the cerebellar circuitry was performed in S218L KI mice to better understand why these mice, and S218L FHM1 patients, exhibit cerebellar ataxia. It became apparent that although the gross morphology of the Purkinje cells and their afferent inputs remained intact, the electrophysiological properties of these structures were severely affected by the S218L mutation. At the ultrastructural level, however, abnormalities were noticed as individual parallel fiber varicosities made multiple contacts with dendrite spines of Purkinje cells. Neurotransmitter release from these parallel fiber varicosities was shown to be increased. In addition, S218L KI mice exhibited ectopic spines and spine-like protrusions in the proximal part of Purkinje cell dendrites. These data suggest that abnormal synapse organization in the cerebellar molecular layer in S218L KI mice, probably leads to a relevant disturbance in the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in neurons, which in turn causes irregular firing of Purkinje cells. Although irregular firing was demonstrated as a likely cause of cerebellar ataxia associated with  $\text{Ca}_v2.1$  *loss-of-function* mutations, S218L KI mice showed for the first time that too much  $\text{Ca}^{2+}$  influx can lead to similar phenotypic problems.

The results of the experiments described in the first eight chapters of this thesis are discussed in *Chapter 9*, also in relation to existing literature. The results have important implications for understanding the mechanisms of abnormal motor coordination. First of all, it was shown that there is a clear connection between  $\text{Ca}_v2.1$  channels and abnormal motor coordination. In addition, the results provided compelling evidence that a lack of  $\text{Ca}_v2.1$  channels in Purkinje cells results in an ataxic phenotype and progressive loss of these neurons. No such effects were observed when  $\text{Ca}_v2.1$  channels were not present in cerebellar granule cells. Instead, a novel role for these channels in the consolidation of newly acquired motor learning was identified. Even though no cerebellar ataxia was noticed in transgenic mice overexpressing T666M-mutated  $\text{Ca}_v2.1$  channels in Purkinje cells, such a phenotype could be linked to abnormal functioning of these cells in homozygous S218L KI mice. One possible explanation for this obvious discrepancy is that presence of the wild-type  $\text{Ca}_v2.1$ - $\alpha_1$  protein in the overexpressing transgenic mice prevents the appearance of an ataxic phenotype, as it does in heterozygous S218L KI mice.

## SAMENVATTING

Voltage-geactiveerde  $\text{Ca}^{2+}$  kanalen (VGCC) laten  $\text{Ca}^{2+}$  instroom toe in exciteerbare cellen, die in neuronen excitatie koppelen aan neurotransmitterafgifte. VGCCs zijn grote, multimere, eiwitcomplexen die bestaan uit een doorgangvormende  $\text{Ca}_v\text{-}\alpha_1$  subunit en bijbehorende  $\beta$  en  $\alpha_2\delta$ , en in sommige gevallen,  $\gamma$  componenten. Maar liefst tien genen coderen voor  $\text{Ca}_v\text{-}\alpha_1$  componenten die het  $\text{Ca}_v$  kanaal subtype bepalen. Er zijn vier  $\beta$ , drie  $\alpha_2\delta$ , en acht  $\gamma$  componenten, die worden gecodeerd door verschillende genen en die in verschillende combinaties kunnen voorkomen met  $\text{Ca}_v\text{-}\alpha_1$  componenten, en zo zorgen voor een grote verscheidenheid aan  $\text{Ca}_v$  kanalen. De introductie van dit proefschrift richt zich met name op de rol van  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen in relatie tot ziekte en hoe zij bijdragen aan “calciumkanalopathiën” (Hoofdstuk 1). Neuronale  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen komen overal voor in het centrale zenuwstelsel (CZS), waar zij cruciaal zijn voor een snelle neurotransmitterafgifte. In de periferie (d.w.z., het perifere zenuwstelsel of PZS), komen ze tot expressie in neuronen van de neuromusculaire junctie (NMJ), waar zij de presynaptische afgifte van acetylcholine (ACh) verzorgen. Mutaties in  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen hebben een grote kans om de neurotransmitterafgifte te verstoren met synaptische dysfunctie als gevolg.

Een belangrijke ziekte die verbonden is met calciumkanaalmutaties is familiere hemiplegische migraine type 1 (FHM1), die kan voorkomen met ander neurologische fenotypes, zoals verschillende vormen van epilepsie en permanente ataxie.  $\text{Ca}_v2.1$  kanaalmutaties worden ook gevonden in patiënten met episodische ataxie type 2 (EA2) en in patiënten met laat-optredende spinocerebellaire ataxie type 6 (SCA6). Verscheidene natuurlijk-voorkomende muismutanten zijn beschikbaar om de consequenties van mutante  $\text{Ca}_v2.1$  kanaaleiwitten te onderzoeken. Verschillende muismutanten hebben een aminozuur (zoals in *tottering*, *rolling Nagoya*, en *rocker*) of leesraam/deletie (zoals in *leaner*) mutatie in de  $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_{1A}$  component, die gecodeerd wordt door het *Cacna1a* gen. *Lethargic* heeft een deletiemutatie in het  $\beta_4$  (*Cacnab4*) gen. Muismutant *ducky* heeft een *null* mutatie in het  $\alpha_2\delta_2$  product van het *Cacna2d2* gen. *Stargazer* heeft een versturende mutatie in het  $\gamma_2$  eiwit (*Cacnag2* gen). Deze mutanten laten een imposante overlap zien in neurologische fenotypes bestaande uit (ernstige) ataxie, stereotypische bewegingsafwijkingen, en in enkele gevallen epilepsie of zelfs vroegtijdige sterfte. In het bijzonder, de electrofysiologische en biochemische analyse van deze natuurlijk-voorkomende muismutanten heeft aangetoond dat een afwijkende  $\text{Ca}_v2.1$  kanaalfunctie gecompenseerd kan worden door specifieke opregulatie van andere neuronale  $\text{Ca}_v$  kanaaltypes, afhankelijk van het neuronale celtype. Echter, hun wijde expressie in het CZS staat een gedetailleerdere bestudering van de celspecifieke rol van  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen in de weg.

Dit proefschrift heeft als doel te onderzoeken wat de celspecifieke rol is van  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen, voornamelijk in relatie tot coördinatie van beweging, waarvoor bestaande en nieuwe transgene muismodellen werden gegenereerd en/of geanalyseerd. Hiertoe werd







het endogene *Cacna1a* gen gemodificeerd door middel van conditionele *knockout* (KO) en *knock-in* (KI) gen-targetingstrategieën. Daarnaast hebben we met conventionele transgenese kopieën van een gemuteerd humaan *CACNA1A* cDNA geïntroduceerd in het muizengenoom. We verwachten dat deze modellen ons zullen helpen om de rol op te helderen van  $\text{Ca}_v2.1$  kanaalfunctie in de pathofysiologische mechanismen van motorcoördinatie, zoals ataxie. De muizen werden onderzocht met een groot aantal (neuro)biologische onderzoeksmethoden om ons inzicht in de (ultra)structurele, electrofysiologische, en gedragsaspecten van  $\text{Ca}_v2.1$  kanaalaandoeningen te vergroten.

De *Hoofdstukken 2* & *3* beschrijven de consequenties van mutaties in  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen in (natuurlijk-voorkomende muismutanten en  $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_{1A}$  KO muizen) met betrekking tot neurotransmitterafgifte van de NMJ; een vaakbestudeerde 'enkel-neuron' synaps van het PZS.

De electrofysiologische respons op ACh afgifte werd gemeten in *ducky*, *lethargic* en *stargazer* muizen die respectievelijk werkzame bijbehorende  $\alpha_2\delta_2$ ,  $\beta_4$  of  $\gamma_2$  componenten missen (*Hoofdstuk 2*). De hypothese is dat de spontane en/of de met zenuwstimulatie-opgewekte (geïnduceerde) neurotransmitterafgifte afwijkend zullen zijn in deze mutanten. *In vitro* 'whole-cell patch clamp' metingen en biochemie hadden eerder laten zien dat de bijbehorende componenten een effect konden hebben op de membraanexpressie (in het geval van de  $\beta_4$  component), en specifieke biofysische eigenschappen (in het geval van de  $\alpha_2\delta_2$  en  $\gamma_2$  componenten) van  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen. Er werden geen significante afwijkingen waargenomen in *ex vivo* metingen van NMJs van *ducky*, *stargazer* en *lethargic* muizen. De implicaties van deze bevinding zijn tweeledig: hetzij wordt het gebrek van de  $\alpha_2\delta_2$ ,  $\beta_4$  en  $\gamma_2$  componenten in dit motorzenuwuiteinde efficiënt gecompenseerd door andere  $\text{Ca}_v$  kanaalcomponenten (d.w.z. er is sprake van een functionele redundantie) of, hoewel er geen aanwijzingen zijn in de literatuur die hier op wijzen, spelen de  $\beta_4$ ,  $\alpha_2\delta_2$ , and  $\gamma_2$  componenten geen rol van betekenis in deze synaps.

Uitschakeling van de  $\alpha_{1A}$  component in voorhanden  $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_{1A}$  KO muizen liet een ~50% afname van de spontane en geïnduceerde ACh afgifte in de NMJ zien die gepaard ging met een ernstig fenotype van dystonie, ataxie, en sterfte kort na de geboorte. Om vroege sterfte te voorkomen en om de verwijdering van  $\text{Ca}_v2.1$   $\text{Ca}^{2+}$  kanalen in PZS en CZS neuronen nauwkeuriger in plaats en tijd te kunnen bestuderen, hebben we transgene muizen gemaakt met een zogenaamd conditioneel, 'floxod', *Cacna1a* allel (*Hoofdstuk 3*). 'Floxod' muizen lieten geen zichtbare afwijking zien van hun gedrag. De cytoarchitectuur van de hersenen was eveneens normaal. Daarnaast waren er geen aanwijzingen dat het expressiepatroon van  $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_{1A}$  en de  $\text{Ca}_v2.1$ -afhankelijke neurotransmitterafgifte in de NMJ gestoord was. Kruising van de 'floxod' muizen met *EIIA-Cre* deleter muizen resulteerde in de verwijdering van  $\text{Ca}_v2.1$  kanalen in alle kernhoudende cellen. De dubbel-transgene muizen hadden een ernstig fenotype dat identiek was aan dat van conventionele  $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_{1A}$  KO muizen. Verlies van  $\text{Ca}_v2.1$  kanaalactiviteit kon worden aangetoond met electrofysiologische analyse van NMJs van de muizen.

Coördinatie van de fijne motoriek is een samenspel van subtiele acties van het cerebellaire circuit, waarbij verschillende neuronen, zoals de inferieure olijkern-, korrel- en Purkinje-cellen een belangrijke rol spelen. Afwijkingen in dit circuit resulteren in afwijkingen van de loop of gang (d.w.z. zij leiden tot ataxie). Hoewel  $Ca_v2.1$  kanalen hoog tot expressie komen in de kleine hersenen is het nog onduidelijk hoe belangrijk die kanalen zijn voor de functie van de verschillende cerebellaire neuronen. *Hoofdstukken 4, 5 en 6* richten zich op het ontrafelen van de celspecifieke functies van wildtype en mutante  $Ca_v2.1$  kanalen wat betreft de coördinatie van beweging.

In de *Hoofdstukken 4 en 5* wordt de functie onderzocht die wildtype  $Ca_v2.1$  kanalen hebben in twee cerebellaire celtypes waarin  $Ca_v2.1-\alpha_{1A}$  hoog tot expressie komt: de Purkinje-cellen en de korrelcellen. Cel-specifieke  $Ca_v2.1$  KO muizen werden verkregen door ‘floxod’ (conditionele)  $Ca_v2.1-\alpha_{1A}$  muizen te kruisen met transgene muizen die een *Gaba<sub>A6</sub>*-gedreven of een *L7/pcp-2*-gedreven *Cre-recombinase* transgen bevatten. Nakomelingen uit de eerste kruising missen  $Ca_v2.1$  kanalen in cerebellaire korrelcellen. Dubbel-transgene dieren uit de tweede kruising zijn deficiënt voor deze kanalen in Purkinje-cellen. Afwezigheid van  $Ca_v2.1$  kanalen in Purkinje-neuronen, maar niet in korrelcellen, bleek te resulteren in cerebellaire ataxie. Cerebellaire ataxie in *Purkinjecel Ca<sub>v2.1</sub> kanaal deficiënte* muizen begint al op jonge leeftijd als de Purkinje-cellen nog aanwezig zijn, en ging gepaard met een grote mate van Purkinje-cel verlies op latere leeftijd. Terwijl synaptische transmissie van parallelvezel – Purkinje-cel synapsen in *korrelcel Ca<sub>v2.1</sub> kanaal deficiënte* muizen sterk verminderd was, leidde dit tot slechts kleine defecten in de motoriek. Hoewel deze mutante muizen motorische taken zonder problemen konden uitvoeren, bleken zij niet in staat paradigma’s van de vestibuloculaire reflex (VOR) aan te leren. De muizen konden wel hun zogenaamde “VOR gain” verminderen, maar bleken de aangeleerde compensatoire oogbewegingen snel te ‘vergeten’. Dit duidde op een nieuwe functie van  $Ca_v2.1$  kanalen in korrelcellen bij het consolideren van leergedrag van de motoriek.

In *Hoofdstuk 6* werd bestudeerd of permanente ataxie, zoals die gevonden wordt met bepaalde FHM1 mutaties, veroorzaakt wordt door een abnormale  $Ca_v2.1$  kanaalfunctie in Purkinje-cellen. Hiertoe werden verschillende muizenlijnen gemaakt met behulp van conventionele transgenese waarbij *T666M*-mutant  $Ca_v2.1-\alpha_{1A}$  eiwit werd geproduceerd van een Purkinje-cel-specifiek, *L7/pcp-2* promotor-gedreven, humaan *CACNA1A* cDNA construct. Onze hypothese was dat vanwege de reeds bekende “gain-of-function” effecten van FHM1 mutaties op enkel-kanaalniveau, expressie van een transgen voldoende zou moeten zijn om een ataxisch fenotype in muizen te veroorzaken. Door het introduceren van een EGFP reporter cDNA sequentie die gescheiden wordt van de *CACNA1A* sequentie door een DNA sequentie van het encephalomyocarditis virus (ECMV) dat codeert voor interne ribosomale bindingsplaats (“internal ribosomal entry site” of IRES), is het mogelijk om celtypes die het transgen tot expressie brengen, te identificeren. De consequentie van de gekozen strategie is dat mutant  $Ca_v2.1-\alpha_{1A}$  eiwit en EGFP eiwit beide worden vertaald van een enkel messenger molecuul. Drie

transgene lijnen lieten expressie van het reportereiwit zien in Purkinje-cellen. ‘Real-time PCR’ toonde aan dat het expressieniveau van het transgen relatief gering was ten opzichte van het endogene *Cacna1a*. Dit is een mogelijke verklaring waarom de transgene muizen geen afwijkend fenotype lieten zien als zij motortaken moesten uitvoeren.

*Hoofdstuk 7* beschrijft de generatie en gedetailleerde analyse van een nieuwe *knock-in* (KI) muisstam die de FHM1 S218L mutatie draagt. S218L patiënten vertonen hemiplegische migraine, progressieve ataxie en een verhoogde gevoeligheid voor epilepsie en mild hoofdtrauma-geïnduceerd oedeemvorming. Zoals in het humane fenotype, hebben de S218L KI muizen last van een milde, permanente cerebellaire ataxie die niet gepaard lijkt te gaan met spierzwakte (*Chapter 7*). Bovendien hebben de S218L KI muizen een verminderde levensverwachting, die waarschijnlijk veroorzaakt wordt door een verhoogde gevoeligheid voor toevallen. Op moleculair niveau vertonen de S218L KI muizen een verhoogde calciuminstroom in cerebellaire korrelcel-neuronen en een verhoogde neurotransmitterafgifte in de NMJ. S218L KI muizen blijken ook een hogere gevoeligheid te hebben voor “cortical spreading depression” (CSD), een langzaam voortbewegende golf van neuronale en glia-cel depolarisatie die de migraine aura definieert. De consequenties van de FHM1 S218L mutatie op calciuminstroom, spontane neurotransmitterafgifte, en belangrijke CSD kenmerken zijn in deze muizen ernstiger mate aangedaan dan in eerder gegenereerde KI muizen die de FHM1 R192Q mutatie bevatten. Die muizen, in tegenstelling tot homozygote S218L KI muizen, laten geen gedragsfenotype zien met cerebellaire ataxie en epilepsie.

Voor *Hoofdstuk 8* werd in meer detail gekeken naar de morfologische en electrofysiologische kenmerken van het cerebellaire circuit in S218L KI muizen om zo beter te begrijpen waarom deze muizen, en S218L FHM1 patiënten, cerebellaire ataxie hebben. Hoewel op lichtmicroscopisch niveau de morfologie van Purkinje-cellen en hun afferente input intact is, bleken de electrofysiologische kenmerken van deze structuren ernstig gestoord te zijn door de S218L mutatie. Echter, op ultrastructureel niveau, werden wel afwijkingen gevonden; individuele parallelvezel varicositeiten maakten *meerdere* contacten met zogenaamde “dendritic spines” van Purkinje-cellen. Neurotransmitterafgifte van deze parallelvezel varicositeiten bleek verhoogd te zijn. Bovendien vertoonden het proximale deel van Purkinje-cel dendriten van S218L KI muizen ectopische “spines” en “spine-like protrusions”. Deze bevindingen duiden op een afwijkende synaps organisatie in de cerebellaire moleculaire laag van S218L KI muizen. Dit leidt waarschijnlijk tot een behoorlijke verstoring van de calciuminstroom in neuronen, wat weer een onregelmatig vuren van Purkinje-cellen tot gevolg heeft. Onregelmatig vuren werd eerder al gepostuleerd als de oorzaak van cerebellaire ataxie, zoals die gevonden wordt met  $Ca_v2.1-\alpha_{1A}$  “*loss-of-function*” mutaties, maar de S218L KI muizen laten voor de eerste keer zien dat ook teveel calciuminstroom kan leiden tot hetzelfde fenotype.

In *Hoofdstuk 9* worden de bevindingen van de in de eerdere hoofdstukken van dit proefschrift beschreven experimenten beschouwd, ook in relatie tot de bestaande literatuur. De bevindingen hebben belangrijke implicaties voor het begrijpen van mechanismen die betrokken zijn bij afwijkende motorcoördinatie. Zo werd duidelijk dat er een duidelijke relatie is tussen  $Ca_v2.1$  kanalen en afwijkende motorcoördinatie. De resultaten geven een overduidelijk bewijs dat het gemis van  $Ca_v2.1$  kanalen in Purkinje-cellen leidt tot een ataxie fenotype met een progressief verlies van deze neuronen. Zulke effecten worden niet waargenomen als  $Ca_v2.1$  kanalen afwezig zijn in cerebellaire korrelcellen. Echter, we ontdekten wel een nieuwe functie van deze kanalen in de consolidering van het leren van motorgedrag. Hoewel we geen cerebellaire ataxie waarnamen in transgene muizen waarin T666M-gemuteerde  $Ca_v2.1$  kanalen in Purkinje-cellen tot expressie kwamen, konden we dit fenotype wel koppelen aan een afwijkende functionering van deze cellen in S218L KI muizen. Het zou kunnen dat de aanwezigheid van wildtype  $Ca_v2.1-\alpha_{1A}$  genproduct het ataxie fenotype heeft voorkomen, zoals ook heterozygote S218L KI muizen geen motorcoördinatie problemen hebben.



## LIST OF PUBLICATIONS

Todorov B, van de Ven RC, Kaja S, Broos LA, Verbeek SJ, Plomp JJ, Ferrari MD, Frants RR, van den Maagdenberg AM. Conditional inactivation of the *Cacna1a* gene in transgenic mice. *Genesis*. 2006;44:589-94.

Kaja S, Todorov B, van de Ven RC, Ferrari MD, Frants RR, van den Maagdenberg AM, Plomp JJ. Redundancy of Cav2.1 channel accessory subunits in transmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res*. 2007;1143:92-101.

Zitman FM, Todorov B, Jacobs BC, Verschuuren JJ, Furukawa K, Furukawa K, Willison HJ, Plomp JJ. Neuromuscular synaptic function in mice lacking major subsets of gangliosides. *Neuroscience*. 2008;156:885-97.

Zitman FM, Todorov B, Verschuuren JJ, Jacobs BC, Furukawa K, Furukawa K, Willison HJ, Plomp JJ. Neuromuscular synaptic transmission in aged ganglioside-deficient mice. *Neurobiol Aging*. 2009 Feb 20. [Epub ahead of print]

Zitman FM, Todorov B, Furukawa K, Furukawa K, Willison HJ, Plomp JJ. Total ganglioside ablation at mouse motor nerve terminals alters neurotransmitter release level. *Synapse*. 2010;64:335-8.

van den Maagdenberg AM, Pizzorusso T, Kaja S, Terpolilli N, Shapovalova M, Hoebeek FE, Barrett CF, Gherardini L, van de Ven RC, Todorov B, Broos LA, Tottene A, Gao Z, Fodor M, De Zeeuw CI, Frants RR, Plesnila N, Plomp JJ, Pietrobon D, Ferrari MD. High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca(v)2.1 S218L mice. *Ann Neurol*. 2010;67:85-98.



## CURRICULUM VITAE

Boyan Todorov was born on April 9<sup>th</sup>, 1979, in Sofia, Bulgaria. After graduating from the National High School for Mathematics and Natural Sciences in Sofia in 1997, he studied pharmacy at the Medical University of Sofia. During his studies there, Boyan worked on two research projects: one in the field of human genetics (“*Detection of mutations in apolipoprotein B100 in hypercholesterolemic patients from Bulgarian origin*”, 1999), and another in pharmaceuticals (“*Development and characterization of extended release, bi-layer tablet formulation of hydrochlorothiazide and metoprolol*”, 2002). The later project formed the basis of his MSc thesis. Boyan graduated “*cum laude*” in pharmacy in 2003, and started his PhD research in medical sciences at the University of Leiden, the Netherlands, directly afterwards. In 2008, he began a postgraduate degree in healthcare economics, policy, and law at the Institute for Health Policy and Management, Erasmus University, Rotterdam, the Netherlands.

During his Master’s studies, Boyan did volunteer work for the International Pharmaceutical Students Federation (IPSF). He also served on the IPSF Executive Board, two years as secretary general of the organization. For his services, Boyan was elected Honorary Life Member of IPSF in 2004. During his doctoral studies in Leiden, Boyan served on the Steering Committee of the Young Pharmacists Group of the International Pharmacists Federation (FIP).

Boyan became a registered pharmacist in Bulgaria in 2003 and in the Netherlands in 2007. Since June 2008, he has held a part-time position as research fellow at Leiden University Medical Centre. He combines this work with a consulting practice as medical advisor in a large medical communications agency in Amsterdam, the Netherlands.









