Thesis of PhD dissertation

#### Local Monitoring and Modeling of the Spatio-temporal Spread of Ca<sup>2+</sup> Signals Initiated by Single or Multiple Action Potentials in Frog and Rat Sympathetic Ganglion Neurons

Author: Zoltán Cseresnyés Supervisor: Prof. Dr. Gáspár Bánfalvi



DEBRECENI EGYETEM Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Biológia Doktori Program Debrecen, 2009

#### **1. INTRODUCTION**

Global Ca<sup>2+</sup> signals have been extensively studied in mammalian sympathetic neurons. However, relatively little is known about the details of local, subcellular  $Ca^{2+}$  signals. In addition to robust Ca<sup>2+</sup> influx via voltage- and ligand gated  $Ca^{2+}$  channels of the plasma membrane,  $Ca^{2+}$ release from the endoplasmic reticulum (ER) has also been shown to contribute to Ca<sup>2+</sup> transients in frog sympathetic ganglion neurons. Here we use video rate confocal fluo-4 fluorescence imaging to show that single action potentials (APs) reproducibly trigger rapidly rising  $Ca^{2+}$ transients at 1 - 3 local "hot spots" within the peripheral ER-rich layer in intact neurons in fresh ganglia, and in the majority (74 %) of cultured neurons. Ca<sup>2+</sup> signals spread into the cell at constant velocity across the ER in non-nuclear regions, indicating active propagation, but spread with a  $(time)^{1/2}$  dependence within the nucleus. consistent with diffusion. 26 % of cultured cells exhibited uniform  $Ca^{2+}$  signals around the periphery, but hot spots were produced by loading the cytosol with EGTA or by bathing the cells in low-Ca<sup>2+</sup> Ringer's solution. Peripheral hot spots for Ca<sup>2+</sup> release within the perinuclear and axon hillock regions provide a mechanism for preferential initiation of nuclear and axonal Ca<sup>2+</sup> signals by action potentials in sympathetic ganglion neurons.

We also establish a model that accounts for the observed spatial and temporal properties

of AP-induced  $Ca^{2+}$  transients. Our simple but fully generalized model successfully simulates the  $Ca^{2+}$  fluxes between six subcellular domains, as well as estimates the relative importance of  $Ca^{2+}$  signaling mechanisms assigned to the plasma membrane, the endoplasmic reticulum and the mitochondria in each of these domains. The domains correspond to the six functionally and/or morphologically distinct sub-areas of a typical sympathetic ganglion neuron, but could easily be translated to fit other cell types. In addition, our model proves very useful in separating mixed  $Ca^{2+}$  signals that were detected from in-focus and out-of-focus domains.

#### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Ganglion dissection and cell culture

Frogs (*Rana pipiens*) were chilled in ice for 30 minutes and then sacrificed by decapitation and pithing. The two chains of sympathetic ganglia were isolated, desheathed and placed into a  $Ca^{2+}$ -free Ringer's solution containing 3.3 mg/mL collagenase

Intact ganglia were loaded with  $20 \,\mu M$  fluo-4 AM in the presence of  $200 \,\mu M$  neostigmine.

In order to isolate neurons for culture, individual cells were isolated from the digested tissue by trituration. The cells were then plated in cover glass-bottom Petri dishes coated with poly-L-lysine, and cultured for 2-7 days at 22-24 C.

For studies on *mammalian cells*, superior cervical ganglion (SCG) neurons were

enzymatically dissociated from 5-week-old male Wistar rats as described elsewhere [Garcia-Ferreiro et al., 2001].

#### 2.2. Confocal imaging

Studies of frog neurons were carried out via confocal imaging experiments using a Nikon RCM-8000 video-rate system,. Cells were imaged with a Nikon 60X NA 1.2 waterimmersion objective lens. Rat SCG neurons were studied via confocal imaging experiments on a Zeiss LSM 5 Live system, based on an Axiovert 200M inverted microscope. Cells were imaged with a 63X NA 1.2 water immersion objective lens.

Principal <u>rat</u> SCG neurons were selected for  $Ca^{2+}$  experiments based on their size (> 15  $\mu$ M in diameter). Brief electrical field stimuli were applied via two parallel platinum wires, positioned at the bottom of the dish, ~5 mm apart.

In <u>frog</u> cell cultures, the larger cells ("B" cells) were selected for all experiments. Sometimes a given neuron was repeatedly activated (3 to 6 times in most experiments), with the same field stimulus. The images corresponding to a given elapsed time in each series were averaged off-line.

#### 2.3. Electrophysiology

Membrane potential measurements were performed in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique (Hamill et al., 1981) using an EPC-10 amplifier (HEKA Instruments Inc., Germany). The sampling frequency was 10 kHz (filtered at 3 kHz).

### **2.4.** Computer model for simulating local Ca<sup>2+</sup> signals

A custom written FORTRAN computer program performed the numeric simulations of subcellular  $Ca^{2+}$  responses. The main components of  $Ca^{2+}$  signaling included in the model were plasma membrane  $Ca^{2+}$  entry (plasma membrane voltagegated and leak  $Ca^{2+}$  channels),  $Ca^{2+}$  release from the ER via RyRs and IP<sub>3</sub>Rs,  $Ca^{2+}$  accumulation and release by the mitochondria, and removal of cytosolic  $Ca^{2+}$  by ER and plasma membrane  $Ca^{2+}$ pumps.

#### 3. RESULTS

# **3.1.** Local monitoring of Ca<sup>2+</sup> signals initiated by single or multiple action potentials

In this dissertation, we examined neurons in intact ganglia and in cell cultures. We applied electrical field stimuli to generate somatic action potentials (APs). AP-induced plasma membrane (PM) depolarisations were found to activate voltage gated calcium channels (VGCC), which in turn resulted in  $Ca^{2+}$  influx from the calcium-rich extracellular space into the cytosol of the neuron.

# **3.1.1** Local peripheral Ca<sup>2+</sup> hot spots in neurons in intact sympathetic ganglia and in cultured neurons.

We observed that the AP-induced Ca<sup>2+</sup> transients were spatial and temporally <u>non-uniform</u> around

the periphery of all cells studied in intact ganglia, as well as in the large majority of cultured neurons. We have shown that these non-uniform responses consisted of 1 to 3 local "hot spots", i.e. small sub-PM areas with rapidly rising and falling  $Ca^{2+}$  transients.

### **3.1.2.** Some cultured SGNs exhibit uniform peripheral Ca<sup>2+</sup> responses

We found that a sub-group of cultured neurons produced peripherally <u>uniform</u> Ca<sup>2+</sup> transients when stimulated with single or multiple APs. However, even in these uniformly responding cells, it was possible to reveal "hot spots" by loading the cells' cytosol with the slow Ca<sup>2+</sup> buffer EGTA, as well as by lowering the extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration to 0.1 mM, i.e. approximately  $1/20^{\text{th}}$  of the normal extracellular calcium level.

### **3.1.3.** Excluding possible artifacts behind the appearance of hot spots

We have also studied the possibility of artificial origins behind the observation of hot spots. Firstly, we found that the localized peripheral signals observed in response to single APs were not due to non-responsive dye. Here we observed that trains of APs or extracellular application of the calcium ionophor ionomycin successfully elevated  $Ca^{2+}$  sensitive cytosolic fluorescence throughout the entire cell when applied to the same neurons where APs only induced  $Ca^{2+}$  responses at hot spots beforehand.

We also observed that the hot spot locations were likely to be structurally determined: one hot

spot was nearly always at the location of the axon hillock, whereas another one existed in the peripheral perinuclear area of the cytoplasm.

# **3.1.4.** Ca<sup>2+</sup> release from internal stores by CICR is critical for AP-induced local peripheral Ca<sup>2+</sup> responses

We have shown that the  $Ca^{2+}$  influx also activated calcium induced calcium release (CICR) via ryanodine receptors (RyRs) of the sub-plasma membrane endoplasmic reticulum (ER). The importance of CICR in the generation of these AP-induced calcium transients was proven by using various tools to deplete the ER  $Ca^{2+}$  store, which then eliminated the hot spots. Here we used the sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibitor cyclopiezonic acid (CPA) to block the refilling of the ER  $Ca^{2+}$  store, or the RvR receptor activator ryanodine (Ry) to empty the ER calcium store by locking the RyR  $Ca^{2+}$  channels in a fully open state. With either method we succeeded in eliminating or massively decreasing the AP-induced Ca<sup>2+</sup> transients.

At the same time, ER  $Ca^{2+}$  store refilling was shown to restore the ability of the neuron to respond with  $Ca^{2+}$  transients to APs. Here we used large cytosolic  $Ca^{2+}$  transients, induced by the extracellular application of 50 mM K<sup>+</sup>, to reload the ER  $Ca^{2+}$  stores with  $Ca^{2+}$  after the SERCA pump activity and/or RyR gating were properly restored. In these cases, the hot spots always reappeared at their original locations, but no hot spots appeared at any new locations.

#### **3.1.5.** Functional significance of the hot spots

As for the possible functional significance of these hot spots, we speculate that the peripheral perinuclear hot spot may serve as a very efficient beacon that signals the arrival of an external stimulus directly to the nucleus, thus enabling the cell to reliably decode this message. The efficiency of this hot spot as a signal transmitter is due partly to its closeness to both the VGCCs of the PM and the nucleus, and partly to the high density of functional ER in the narrow gap between the PM and the nuclear envelope in the perinuclear area. This arrangement may allow the AP-induced  $Ca^{2+}$  influx to elevate the cytosolic Ca<sup>2+</sup> level to a high value in the narrow perinuclear space, thus activating massive CICR from the abundant nearby ER  $Ca^{2+}$  stores. The short distance to the nuclear envelope allows the diffusion of all this  $Ca^{2+}$  to be fast and with little loss.

The other hot spot that was typically found near the axonal hillock may also serve a beacon, transmitting AP-induced  $Ca^{2+}$  signals directly to the axon.

## 3.2. Modeling of the spatio-temporal properties of $Ca^{2+}$ signals initiated by action potentials

#### **3.2.1.** General aspects of the model

The second half or our work describes a multicompartmental computer simulation to account for the observed dynamics of the intracellular local  $Ca^{2+}$  signals initiated by AP-induced  $Ca^{2+}$ entry. The computer model was built based upon the morphological and functional findings that were described in the first half of our results. The model describes the  $Ca^{2+}$  fluxes between the extracellular space, the cytoplasm, the  $Ca^{2+}$  stores of the ER and of the mitochondria.

### **3.2.2. Differential equations and their solutions: limitations and advantages**

We composed a series of differential equations to behavior of describe the sub-cellular These equations combine the compartments. mathematical expressions describing the main transport mechanisms related to the Ca<sup>2+</sup> reaction/diffusion kinetics of the cellular system. We solved our model system's differential equations numerically, using a computer-based approximation for solving differential equations. We limited our calculations to 6 spatial domains, instead of attempting to provide a continuous solution for two or three spatial dimensions, thus providing a toolkit that can be easily run on any modern PC.

# 3.2.3. Experimental and simulated studies of the role of the PMCA in $Ca^{2+}$ removal after AP-induced $Ca^{2+}$ influx

We confirmed that the plasma membrane  $Ca^{2+}$ ATPase (PMCA) constitute the main  $Ca^{2+}$  efflux mechanism during the decline of intracellular  $Ca^{2+}$  following  $Ca^{2+}$  influx-induced transient elevations. The majority of the decline of the  $Ca^{2+}$  transient thus seems to be provided by PMCA, since blocking PMCA by high extracellular pH (pH 9.0) essentially halts further  $Ca^{2+}$  removal. The intracellular amplification of  $Ca^{2+}$  signals relies mostly on the intrinsic plasma membrane properties, above all on repetitive firing.

### **3.2.4.** Simulations of single and multiple AP-induced Ca<sup>2+</sup> transients

Here we examined the effect of single and multiple AP-like stimuli in SCG neurons. We applied our model to reproduce single  $Ca^{2+}$  transients as well as more complex temporal patterns of cytosolic  $Ca^{2+}$  generated by periodic stimuli of phasic neurons. Our analysis of more complex temporal and spatial patterns confirmed that the parameter set that successfully described the complex patterns, also automatically reproduced the single  $Ca^{2+}$  transients, recorded from the same cell.

### **3.2.5.** Our model simulations confirm the sink-like behavior of the ER Ca<sup>2+</sup> stores

In our model systems, the RyR conductance was expressed as a sum a  $Ca^{2+}$  independent and a  $Ca^{2+}$ dependent component. Even when we varied the relative contributions of these components, as well as increased or decreased the sensitivity of the RyRs'  $Ca^{2+}$  conductance to cytosolic  $Ca^{2+}$ , our model simulations always indicated that the ER  $Ca^{2+}$  stores behaved as net  $Ca^{2+}$  <u>sinks</u> during simulated  $Ca^{2+}$  transients evoked by single or multiple APs. These results agree well with existing data in mammalian sympathetic neurons (Hernández-Cruz et al., 1997; Wanaverbecq et al., 2003), but disagrees with earlier findings by ourselves and others in frog sympathetic ganglion neurons, where CICR was shown to produce a net increase of cytosolic  $Ca^{2+}$ , both in experimental studies (Akita and Kuba, 2000; Cseresnyés and Schneider, 2004) and, more recently, in a model system as well (Patterson et al, 2007). This disagreement may simply be caused by species differences.

# **3.2.6.** Our model is able to isolate the "pure" confocal information from a contaminated optical signal

Our results indicate that the fluorescence signal recorded from the central regions of a cell (D 5 and 6) in any XY plane could be a combination of "pure" signals from more than one theoretical domain: the domain sampled in the focal plane and one or more domains above or below the focal plane. Our examinations show that it is possible, using confocal data and applying our 6domain model, to un-mix the contaminated optical signals and thus to estimate what the "pure" signals would be in an ideal confocal section.

#### 4. SUMMARY

Our results show that spatial non-uniformity of  $Ca^{2+}$  responses to APs is an inherent property of frog SGNs, and that the non-uniformity is maintained in primary cell cultures, even though the hot spots may not always be directly observable in all cultured SGNs. The hot spots possibly serve as information transmitters that signal the arrival of the AP-induced calcium signals to the cell nucleus and the axon.

Our computer simulations proved to be successful in reproducing our experimental characterization of the dynamics of the intracellular local  $Ca^{2+}$  signals initiated by APinduced  $Ca^{2+}$  entry in a multi-compartmental model. The model provided a characterization of the SCG and SGN neuronal systems in terms of  $Ca^{2+}$  fluxes underlying the spatio-temporal properties of local  $Ca^{2+}$  signals during and after single AP induced by electrical field stimulation. Egyszeri és többszörös akciós potenciálok által kiváltott kalcium jelek helyi megfigyelése és számítógépes modellezése béka és patkány szimpatikus ganglion neuronokon

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

#### Cseresnyés Zoltán

#### 1. BEVEZETÉS

Az emlős állatok szimpatikus neuronjaiban megielenő globális Ca<sup>2+</sup> ieleket sokan és sokféleképpen vizsgálták. Keveset tudunk azonban a helyi, sejten belüli Ca<sup>2+</sup> jelekről. Ezen jelek kialakításában nemcsak a Ca<sup>2+</sup> beáramlás játszik szerepet (feszültség és ligand vezérelte  $Ca^{2+}$  csatornákon keresztül), hanem azendoplazmatikus retikulumból (ER) történő Ca2+ kiválasztás is, legalábbis a béka szimpatikus ganglion neuronjaiban. Jelen munkánkban nagysebességű konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a Ca<sup>2+</sup> érzékeny fluo-4 fluoreszcens jelét, és azt találtuk hogy egyszeri akciós potenciálok (AP) egy olyan  $Ca^{2+}$  jelet váltanak ki, amely 1-3 ú.n. forró pontban (FP) nyilvánul meg. Ezek a FP-ok a plazma membrán (PM) alatti, ERban gazdag rétegben találhatóak, és jelen vannak minden intact ganglionban vizsgált neuronban, és a tenvésztett neuronok többségében (76%). A Ca<sup>2+</sup> iel a FP-ból a seit belseje felé áramlik

konstans sebességgel, ami aktív diffúzióra utal. Ugyanakkor a sejmagon belüli terjedésre a négyzetgyökös időfüggés volt jellemző, ami passzív diffúzióra utal. A tenyésztett sejtek 26%a homogén  $Ca^{2+}$  jelet produkált, ám EGTA vagy alacsony sejten kívüli  $Ca^{2+}$  koncentráció hatására a FP-ok itt is előtüntek. A FP-ok segítségével a sejtmag és az axon közvetlenül értesülhetnek az AP-ok által keltett  $Ca^{2+}$  jelekről.

Az AP-ok által keltett Ca<sup>2+</sup> jelek leírására egy számítógépes modellt is készítettünk. Ez az egyszerű de általános model sikeresen leíria a Ca<sup>2+</sup> terjedés megfigyelt jellegzetességeit а sejtben felrajzolt hat tartomány között, ill. azokon belül. Ugyancsak figyelembe vettük az egyes tartományok különböző PM, ER és mitokondrium tartalmát. A model könnyen alkalmazható más sejt típusokra is. Ugyancsak sikerrel alkalmaztuk optikai modellünket complex ielek szétválasztásásra, ill. a fókuszon kivüli jelek eltávolítására

#### 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 2.1. Ganglionok izolálása, sejttenyésztés

Béka (Rana pipiens) egyedeit először jégben lehűtöttük, majd a fej eltávolítása után a gerincvelőt elroncsoltuk. A két ganglion-láncot izoláltuk, lehántoltuk és kollagenáz oldatba helyeztük (3.3 mg-mL).

Az intakt ganglionokat 200 μM neostigmine jelenlétében sikeresen fel tudtuk tölteni fluo-4 AM-mel (20 μM). A tenyésztéshez a megemésztett ganglionokat pipetta hegyen át mozgatva sejtjeire bontottuk. Az így előállított sejteket üvegfenekű Petri edenyben tartottuk, 2-7 napig 22-24C-on.

Az emlős neuronokat SCG-ből (superior servical ganglion) állítottuk elő, 5 hetes Wistar patkányokat használva (ld. Garcia-Ferreiro et al., 2001).

#### 2.2. Konfokális mikroszkópia

A béka neuronok vizsgálata egy Nikon RCM 8000 rendszeren történt, ami videó sebességgel (30 kép per másodperc) gyűjtött 512x512 pixel felbontású képeket. Egy Nikon 60X/NA 1.2 vízimmerziós lencsét használtunk. A patkány SCG neuronok vizsgálatára egy Zeiss LSM 5 LIVE rendszert használtunk, egy 63X/NA 1.2 vízimmerziós lencsével.

A patkány neuronokat méretük alapján választottuk ki (15 µm felett). A téringerlés két párhuzamos elektróda segítségével történt, amelyek az edény alján helyezkedtek el, 5 mm távolságra egymástól.

A tenyésztett béka sejtek közül a nagyobb, "B" típusú neuronokat használtuk. Szükség esetén (pl. alacsony fluo-4 jelszint, zajos kép) a stimulust 3-6 alkalommal megismételtük és a képsorozatokat átlagoltuk.

#### 2.3. Elektrofiziológia

A membrán potenciál mérésére whole-cell konfigurációban került sor (Hamill et al., 1981), egy EPC-10 erősítő (HEKA Instruments Inc., Germany) segítségével. A mintavételezés 10 kHz-en történt, a szúrő 3 kHz-re volt állítva.

#### 2.4. Számítógépes modellezés

A modell számításokat egy általunk írt FORTRAN nyelvű program végezte- A modell fő alkotói: PM Ca<sup>2+</sup> csatornái, Ca<sup>2+</sup> kiválasztás az ER-ból ryanodine és IP3 receptorokon keresztül, Ca<sup>2+</sup> felvétel és leadás a mitokondriumok által, és végül a PM Ca<sup>2+</sup> ATPáz, ami a citoszol Ca<sup>2+</sup> feleslegét távolítja el a PM-on keresztül.

#### 3. EREDMÉNYEK

#### **3.1. Egyszeri és többszöri akciós** potenciálok által kiváltott Ca<sup>2+</sup> jelek helyi megfigyelése

Jelen dolgozatban az idegsejtek viselkedését vizsgáltuk részint teljes ganglionokban, részint sejtekben. pedig tenyésztett Az akciós potenciálok (AP) előállítása végett elektromos téringerlést alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy létrejövő az AP-ok hatására membrán depolarizáció aktivália a feszültség vezérelte kalcium csatornákat, amelyeken keresztül aztán kalcium áramlik a kalciumban gazdag sejtközötti térből a neuron belsejébe.

# **3.1.1.** Helyi Ca<sup>2+</sup> válaszok (forró pontok) intakt szimpatikus ganglionok neuronjaiban és tenyésztett sejtekben.

Megfigyeltük hogy az AP-ok hatásásra létrejött Ca<sup>2+</sup> tranziensek <u>inhomogén</u> módon jelentkeztek mind térben mind pedig időben. Ez az inhomogenitás jellemezte az összes intakt ganglionbéli neuront, s ugyancsak a tenyésztett sejtek nagy részét. Az inhomogén kalcium válaszok együtt jártak 1-3 ú.n. "forró pont" (FP) megjelenésével. A FP egy, a PM alatti régióban megjelenő gyorsan emelkedő és ereszkedő Ca<sup>2+</sup> tranziens.

### **3.1.2.** A tenyésztett neuronok egy része homogén Ca<sup>2+</sup> válaszokat mutat

Megállapítottuk, hogy a tenyésztett sejtek egy része homogén Ca<sup>2+</sup> tranzienst produkált amikor egyszeri vagy ismételt AP-lal stimuláltuk őket. Ugyanakkor még ezen sejtekben is megtaláltuk a FP-kat, ha a sejteket EGTA-val töltöttük meg, vagy pedig a fürdő kalcium tartalmát 0.1 mM-ra (azaz a normal érték 1/20-ra) csökkentettük.

### 3.1.3. A lehetséges műtermékek kizárása ami a FP-ok megfigyelését illeti

Ugyancsak megvizsgáltuk hogy a megfigyelt FPok nem műtermékek-e. Azt találtuk, hogy a FPok megjelenése nem az inhomogén festékeloszlás következménye: nagyszámú AP kiváltása, illetve a  $Ca^{2+}$  ionofór ionomycin alkalmazása a teljes sejtben hozott létre  $Ca^{2+}$ választ, még akkor is ha előzőleg az AP-ok hatására FP-okban jelentkezett a kalcium válasz ugyanazon sejtben.

Megfigyeltük továbbá hogy a FP-ok sejten belüli helye a sejt szerkezetéhez kötődik. Az egyik FP ugyanis csaknem minden sejtben az axon-domb területén jelent meg, míg a második FP a sejtmag és a PM közötti keskeny résben volt megfigyelhető. 3.1.4. A sejten belüli kalcium tartályokból történő kalcium kiáramlás jelentősen hozzájárul az AP-ok által kiváltott helyi Ca<sup>2+</sup> válaszok kialakításához

A kalcium-indukálta kalcium kivalasztás (CICR) szerepe az AP-ok által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensek létrehozásában igen jelentős. Itt azt találtuk, hogy az ER kalcium tartályainak kiűrítése a Ca<sup>2+</sup> tranziensek eltűnését eredményezte. Ezt egyrészt úgy érhettük el, hogy az ER kalcium pumpáit (SERCA) CPA-vel (cyclopiezonic acid) gátoltuk. Másrészt az ER ryanodine receptorainak nyitott állapotban való rögzítése (amit ryanodine hozzáadásával értünk el) is az ER kalcium tartályainak kiürüléséhez vezetett. Mindkét módszer alkalmazása a kalcium tranzeinsek eltűnéséhez, vagy legalábbis nagyon jelentős csökkenéséhez vezetett.

Ugyanakkor az ER kalcium tartályainak gyors újratöltése teljesen helyreállította az AP-ok által kiváltott kalcium tranzienseket. Erre a célra a sejt jelentős depolarizációjával együttjáró Ca<sup>2+</sup> beáramlást használtuk fel. A nagymértékű depolarizációt 50 mM kálium sejten kívülre történő hozzáadásával idéztük elő, miután a SERCA pumpa ill. a ryanodine receptorok normál működését előzőleg helyreállítottuk (a SERCA blokkolók illetve a ryanodine alapos kimosásával). A helyreállított FP-k ugyanott jelentek meg a sejten belül ahol az ER kiürítése előtt voltak, u.a. új FP-k megjelenését egyszer sem figyeltük meg a kimosás után.

#### 3.1.5. A "forró pontok" élettani jelentősége

Ami a FP-ok lehetséges élettani funkcióját illeti, a jelátadó szerepe látszik valószínűnek. A sejtmag elhelyezkedő FP közelében gyorsan és hatékonyan jelezheti a sejtmagnak a külső elektromos inger ill. az AP megérkezését, ezzel lehetővé téve hogy a sejt gyorsan dekódolhassa a beérkezett információt. Ezen FP részint annak köszönheti hatékonyságát, hogy mind a PM kalcium csatornái, mind pedig a seitmag nagvon közel vannak ehhez a FP-hoz, részint pedig annak hogy ebben a PM és sejtmag közötti keskeny tartományban az ER nagyon sűrűn helyezkedik el. Mindezek következményeként az AP-ok által kiváltott Ca<sup>2+</sup> beáramlás igen magas lokális Ca<sup>2+</sup> koncentrációt idézhet elő ebben a keskenv tartományban, ami jelentős CICR megjelenését is eredményezi. A PM és a sejthártya közelsége miatt a diffúziós Ca<sup>2+</sup> veszetség sem jelentős.

A második FP amely általában az axondomb közelében helyezkedik el, valószínűleg hasonló szerepet tölt be, amikor is az AP-ok által indukált  $Ca^{2+}$  jelet közvetlenül az axon felé továbbítja.

### **3.2.** Akciós potenciálok által előidézett Ca<sup>2+</sup> jelek tér- és időbeli viselkedésének modellezése

#### 3.2.1. Általános megjegyzések a modellről

A dolgozat második felében egy számítógépes modellt mutattunk be, melynek segítségével sikeresen reprodukáltuk és jósoltuk a sejtek 6 tartományában megfigyelhető, AP-ok keltette  $Ca^{2+}$  jeleket. A model alapjául szolgáló szerkezeti és funkcionális megfigyelések a dolgozat első felében leírt eredményekből származtak. A model segítségével leírtuk a  $Ca^{2+}$ ionok mozgását a sejten kívüli tér, a citoplazma, az ER és a mitokondriumok  $Ca^{2+}$  tartályai, valamint a sejtmag között.

### **3.2.2. Differenciál egyenletek és megoldásuk:** előnyök és hátrányok

A kalcium ionok sejten belüli viselkedését differenciál egyenletek segítségével irtuk le. Ezen egyenletekben összefoglaltuk mindazon Ca<sup>2+</sup> transzport folyamatokat amelyek ezen neuronokban már ismertek (többek között az általunk 1997-ben leírt Release Activated Calcium Transport, RACT, Cseresnyés et. al., 1997). Az egyenleteket numerikusan oldottuk meg, számítógépes algoritmusok segítségével. Számításainkat csupán sejt-tartományra 6 terjesztettük ki, u.i. a térben folyamatos megoldás jóval nagyobb számítógépes kapacitást igenyelt ami egyúttal a model széleskörű volna. felhasználhatóságát is veszélyeztetné.

# 3.2.3. Kísérletek és szimulációk a PMCA szerepéről amit az AP által előidézett Ca<sup>2+</sup> beáramlás helyreállításában játszik

Eredményeink megerősítették azt a korábbi megfigyelést miszerint az AP érkezése által megemelt sejten belüli  $Ca^{2+}$  eltávolításáért elsősorban a PM  $Ca^{2+}$  ATP-áz (PMCA) a felelős. Megmutattuk ugyanis, hogy a sejten kívüli tartomány pH-jának megemelése (pH 9.0) jelentősen lelassította ill. megszüntette a  $Ca^{2+}$  eltávolítást az AP-ok által előidézett  $Ca^{2+}$  tranziensek után.

**3.2.4.** Egyszeri és többszörös AP-ok által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensek modellezése

A model segítségével megvizsgáltuk az egyedi és ismételt AP-ok hatását. Sikeresen leírtuk nemcsak az egyszerű  $Ca^{2+}$  tranzienseket, hanem a fázisos neuronokban megfigyelhető bonyolultabb jelenségeket is. Megfigyeltük, hogy a bonyolult jelenségeket jól leíró paraméterek automatikusan visszaadták az egyszerű  $Ca^{2+}$  tranzienseket is ugyanazon sejtekben.

# 3.2.5. A model megerősíti hogy az ER kalcium tartályai minden esetben kalcium nyelőként viselkednek

Modellünkben a ryanodine receptorok leírására egy kalcium függő és egy kalcium független kifejezés összegét használtuk. Azt tapasztaltuk, hogy ezen két kifejezés relativ súlvának változtatása, amely a model illesztése során szükséges volt, nem befolvásolta azt a tényt, hogy az ER Ca<sup>2+'</sup> tartálya minden esetben Ca<sup>2</sup> szerepelt. felvevőként Ez az eredmény korábban emlős neuronokon megegyezik а (Hernández-Cruz mértekkel et al.. 1997: Wanaverbecq et al., 2003), de ellenkezik a béka szimpatikus ganglion sejteken mértekkel, ahol a szerepét jelentősnek CICR találták mind kísérletes (Akita and Kuba, 2000; Cseresnyés and 2004), mind pedig szimulációs Schneider. vizsgálatokban (Patterson et al. 2007). Az ellentmondás oka valószínűleg a fajok közötti különbségben rejlik.

### **3.2.6.** A modell képes a "tiszta" konfokális jelek elkülönítésére

Eredményeink azt is megmutatták, hogy a sejtek közel felvett fluoreszcens jelek közepéhez egymáshoz különböző. közeli seittartományokból származó "tiszta" ielek keverékei. Megmutattuk, hogy modellünk segítségével el tudjuk különíteni ezeket az összetevőket, és így ki tudjuk számítani a "tiszta" jeleket.

#### 4. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeinkből arra a következtetünk, hogy a  $Ca^{2+}$  tranziensek inhomogén volta szerves része a béka és patkány szimpatikus neuronok viselkedésének. Ez a viselkedés tenyésztett sejtekben is megmarad, még ha a tenyésztett sejtek egy részében a FP-ok létezése nem látható azonnal. A FP-ok nagy valószínűséggel mint jelátadók szerepelnek, melyek a sejtmag és az axon felé továbbítják az AP indukálta  $Ca^{2+}$  tranzienseket.

Számítógépes modellünk igen hasznosnak bizonyult a AP indukálta  $Ca^{2+}$  jelek leírásában ill. azok jóslásában. A modell jól leírja mind a béka SGN, mind pedig a patkány SCG neuronok viselkedését az AP-k által gerjesztett  $Ca^{2+}$ tranziensek során, figyelembe véve az időbeli és térbeli jellemzőket.

#### **REFERENCES/IRODALOM**

- Akita, T., and K. Kuba. 2000. Functional triads consisting of ryanodine receptors,  $Ca^{2+}$ channels, and  $Ca^{2+}$ -activated K<sup>+</sup> channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of action potential. *J Gen Physiol* 116:697-720
- Cseresnyés Z., M.F. Schneider. 2004. Peripheral hot spots for local  $Ca^{2+}$  release after single action potentials in sympathetic ganglion neurons, *Biophys J* 86:163-81.
- Garcia-Ferreiro R.E., E.O. Hernandez-Ochoa, D.E. Garcia. 2001. Modulation of N-type Ca<sup>2+</sup> channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons, *Pflugers Arch*. 442:848-58.
- Hernandez-Cruz, A., A.L. Escobar, and N. Jimenez. 1997.  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger  $Ca^{2+}$ . *J Gen Physiol* 109:147-67
- Loew L.M., J.C. Schaff. 2001. The Virtual Cell: a software environment for computational cell biology, *Trends Biotechnol.* 19:401-6.
- Patterson M., J. Snead, D.D. Friel. 2007. Depolarization-induced calcium responses in sympathetic neurons: Relative contributions from  $Ca^{2+}$  entry, extrusion, ER/mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake and release, and  $Ca^{2+}$  buffering, *J Gen Physiol*. 129:29-56.

Wanaverbecq N., S.J. Marsh, M Al-Qatari, D.A. Brown DA. 2003. The plasma membrane calcium-ATPase as a major mechanism for intracellular calcium regulation in neurones from the rat superior cervical ganglion, J Physiol. 550:83-101.

#### 10. RESUME; A JELÖLT TUDOMÁNYOS tevékenységének jegyzéke

### Publications used directly for this dissertation:

Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott közlemények

- 1. Hernández-Ochoa, E.O., Cseresnyés, Z., and (2007) Ca<sup>2+</sup> Schneider. M.F. signal summation and NFATc1 nuclear translocation in sympathetic ganglion neurons during repetitive action potentials induced by M-channel inhibition. Cell Calcium 41(6), 559-571.
- 2. **Cseresnyés, Z.,** and Schneider, M.F. (2004). Peripheral hot spots for local Ca<sup>2+</sup> release after single action potentials in sympathetic ganglion neurons. Biophysical Journal 86(1), 163-81.
- McDonough, S.I., Cseresnyés, Z., and Schneider, M.F. (2000). Origin sites of calcium release and calcium oscillations in frog sympathetic neurons. Journal of Neuroscience 20.24, 9059-9070.

4. **Cseresnyés, Z.,** Bustamante, A.I., and Schneider, M.F. (1999). Caffeine-induced  $[Ca^{2+}]$  oscillations in neurones of frog sympathetic ganglia. Journal of Physiology *514.1*, 83-99.

Σ IF: 22.02

#### **Other publications:**

### Egyéb megjelent, vagy közlésre elfogadott közlemények

- Cseresnyés, Z., Schwarz, U., and Green, C.M. (2009): Analysis of replication factories in human cells by super-resolution light microscopy BMC Cell Biology 10:88
- 2. Bischoff, M. and Cseresnyés, Z. (2009) Cell rearrangements, cell divisions and cell death in a migrating epithelial sheet in the abdomen of Drosophila. Development 136(14), 2403-2411.
- 3. Shen, T., Cseresnyés, Z., Liu, Y., Randall, W.R., and Schneider, M.F. (2007) Regulation of NFATc1 nuclear export by protein kinases after slow fiber type electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibers. Journal of Physiology 579(Pt2), 535-551.
- 4. Shen, T, Liu, Y, Cseresnyés, Z, Hawkins, A, Randall<sup>,</sup> WR, and Schneider, M.F. (2006) Activity- and Calcineurin-independent

Nuclear Shuttling of NFATc1, but Not NFATc3, in Adult Skeletal Muscle Fibers. Molec. Biol. Cell 17(4), 1570-1582.

- Thomas, S, Zinter, R., Cseresnyés, Z., Hutter-Paier, B., and Hofmeister, A. (2003). Structured Light Imaging: An Accessible Alternative to Confocal Imaging. American Biotechnology Laboratory 21(11), 14-16.
- Liu, Y., Cseresnyés, Z., Randall, W.R., and Schneider, M.F. (2001). Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibres. Journal of Cell Biology 155(1), 27-39.
- Cseresnyés, Z., Bustamante, A.I., Klein, M.G., and Schneider, M.F. (1997). Releaseactivated Ca<sup>2+</sup> transport in neurons of frog sympathetic ganglia. Neuron 19, 403-419.

ΣIF: 45.36

### Selected conferences with presentations related to the dissertation:

### Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

• Federation of American Societies of Experimental Biology (FASEB) Summer Conference, "Calcium and Cell Function", July 9-14, 2000, Copper Mountain, CO

- 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, February 17-21, 2001, Boston, MA
- "Calcium Signaling" Gordon Research Conference, September 2-7, 2001, Oxford, UK
- 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, Febr. 22-26, 2002, San Francisco, CA
- 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, March 2-5, 2003, San Antonio, TX
- "Calcium Signaling" Gordon Research Conference, July 6-11, 2003, Mt. Holyoke, MA
- International Workshop on Calcium Release and Cellular Calcium Signaling Domains, September 28-October 2., 2003, Marbella, Chile
- 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, February 14-18, 2004, Baltimore, MD
- Society for Neuroscience Annual Meeting, November 2005, San Diego, CA

#### Mentoring: Tehetséggondozás

- 1985-1991 Supervisor of undergraduate students, Debrecen University, Hungary
- 1992-1994 Supervisor of undergraduate and graduate students, Debrecen University School of Medicine, Hungary
- 1995-2007 Supervisor of <u>undergraduate</u> <u>students</u>, University of Maryland Baltimore School of Medicine

<u>Alex Bustamante</u>, undergrad student. <u>Naima Carter</u>, UMBC undergrad student. <u>Ben Busby</u>, UMBC undergrad student,.

1996-2007 Training <u>graduate students</u>, University of Maryland Baltimore School of Medicine

> <u>Macrae Williams</u>, UMB PhD student <u>Ashish Bagal</u>, UMB MD/PhD student <u>Lois Chun</u>, UMB PhD student

1998-2007 Training **postdoctoral fellows**, University of Maryland Baltimore School of Medicine:

> <u>Stefan McDonough PhD,</u> Yewei Liu MD/PhD,