Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Vápníková signalizace magnocelulárních neuronů supraoptického jádra potkanů

Štěpán Kortus

2019

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Lékařská biofyzika

Předseda oborové rady: prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.

Školicí pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR

Školitel: RNDr. Martin Zápotocký, Ph.D.

Konzultant: Dr. Govindan Dayanithi, Ph. D.

Obsah

1 Abstrakt 2
2 Abstract 4
3 Úvod 6
4 Hypotézy a cíle práce 8
4.1 Mechanizmy spontánních $[Ca^{2+}]_i$ oscilací 9
4.2 Ca^{2+} odpovědi vyvolané depolarizací 9
5 Materiály a metodika 10
6 Výsledky 12
6.1 Mechanismy $[Ca^{2+}]_i$ oscilací. 12
6.2 Fyziologie $[Ca^{2+}]_i$ oscilací 14
6.3 Dynamika depolarizací vyvolaných $[Ca^{2+}]_i$ odpovědí 15
7 Diskuse 18
8 Závěr 20
9 Použitá literatura 23
10 Seznam publikací 24

1 Abstrakt

Magnocelulární neurosekreční buňky hypotalamu vysílají své axony do neurohypofýzy, kde do krevního řečiště uvolňují hormony oxytocin a vazopresin. Oxytocin se uplatňuje zejména při porodu a je nezbytný pro stimulaci sekrece mléka během laktace. Základní fyziologickou funkcí vazopresinu je řízení re-absorpce vody v ledvinách, čímž se podílí na regulaci tělesné rovnováhy tekutin. K sekreci hormonů dochází zejména z terminálů neuronů v hypofýze, nicméně hormony jsou secernovány i z dendritů v supraoptickém jádru, kde difundují a ovlivňují okolní buňky skrze autokrinní efekt. Mechanismy řídící sekreci oxytocinu a vazopresinu byly intenzivně studovány během posledních dekád a předpokládá se, že zásadní v porozumění fyziologie sekrece je vztah mezi Ca^{2+} signalizací, sekrecí z dendritů a elektrickou aktivitou magnocelulárních neuronů.

V této práci kombinujeme matematickou analýzu s experimentálním měřením Ca^{2+} signálů izolovaných neuronů ze supraoptického jádra. K jejich identifikaci využíváme transgenní potkany exprimující vazopresin nebo oxytocin značený fluorescenčním proteinem. Studujeme změny Ca^{2+} homeostázy během těhotenství, laktace a dehydratace. Dále se zaměřujeme na spontánní a indukované Ca^{2+} signály a na to, jak autoregulační mechanismus vazopresinu může ovlivňovat sekreci hormonu.

Tato práce přináší detailní analýzu spontánních $[Ca^{2+}]_i$ oscilací a depolarizací indukovaných $[Ca^{2+}]_i$ odpovědí v izolovaných magnocelulárních neuronech. Ukazujeme, jak jsou tyto oscilace ovlivněny fyziologickým statusem organismu (dehydratace, laktace) a vystavením extracelulárním stimulům (osmotická změna, vazopresin). Zaměřujeme se dále na mechanismy nutné ke vzniku Ca^{2+} oscilací a ukazujeme, že pro jejich existenci nejsou nutné akční potenciály, ale že jsou výsledkem vnitrobuněčné aktivity koordinující Ca^{2+} kanály a Na/Ca^{2+} výměník. Nad rámec toho prokazujeme, že vazopresin reguluje $[Ca^{2+}]_i$ oscilace prostřednictvím autokrinní signalizace podobně, jako tomu bylo prokázánu u elektrické aktivity. U Ca^{2+} signálů vyvolaných depolarizací membrány detailně popisujeme, jak jsou odpovědi modulovány stavem naplnění vnitrobuněčných Ca^{2+} zásobníků.

Celkově tato práce pokrývá mechanismy Ca^{2+} signalizace magnocelulárních buněk, které doposud nebyly dostatečně prostudovány, a jejichž znalost je zároveň nezbytná k plnému porozumění fyziologie oxytocinu a vazopresinu.

2 Abstract

The magnocellular neurosecretory cells (MNCs) of the hypothalamus project axons from supraoptic nucleus to the posterior pituitary gland where they secrete either oxytocin or vasopressin into the circulation. Oxytocin is important for delivery at birth and is essential for milk ejection during suckling. Vasopressin primarily promotes water reabsorption in the kidney to maintain body fluid balance.

The profile of oxytocin and vasopressin secretion is principally determined by the pattern of action potentials initiated at the cell bodies in hypothalamus. MNCs principally secrete hormones from terminals in pituitary, but the secretion also occurs from their dendrites in supraoptic nucleus, where they diffuse and affect the neighbouring cells. Mechanisms controlling the oxytocin and vasopressin secretion from MNCs has been extensively studied over the last decades and is assumed that the relationship between Ca^{2+} signalling, secretion form dendrites, and the firing patterns is essential in understanding of the magnocellular neurosecretory system.

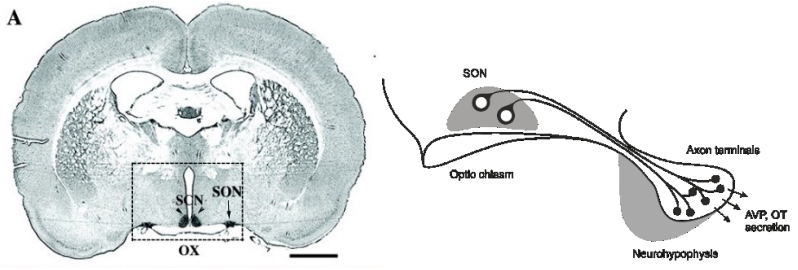
In this project, we combine mathematical analysis and experimental measurements of Ca^{2+} activity of MNCs of transgenic rats expressing an arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein (AVP-eGFP) or oxytocin-monomeric red fluorescent protein (OT-mRFP1). We report a detailed analysis of the spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and depolarization induced $[Ca^{2+}]_i$ elevations in MNCs in isolated conditions. We show how these oscillations are affected by the physiological state of the animal (dehydration, lactation) and by exposure to extracellular stimuli (osmotic change, exposure to vasopressin). In term of mechanisms underlying the oscillations we show that they do not require action potentials are rather mediated by intrinsic mechanisms driven by action of Ca^{2+} channels and the membrane Na^{+}/Ca^{2+} exchanger. On top if it we proved that vasopressin has autoregulatory feedback on oscillating neurones similarly to the autocrine signalling described for the electrical activity. For depolarization induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation we show, in details, how the $[Ca^{2+}]_i$ responses are modulated by the filling state of intracellular Ca^{2+} stores. Taken together this study covers the important Ca^{2+} signalling

mechanisms in MNCs that has not yet been sufficiently described and are essential to understand the physiology of oxytocin and vasopressin secretion.

3 Úvod

Antidiuretický hormon (ADH), neboli vazopresin, a hormon oxytocin (OT) jsou neuropeptidy syntetizované v hypotalamu, odkud jsou axonálním transportem přesouvány do hypofýzy a vylučovány do krevního řečiště [1]. V krevním řečišti tyto hormony zejména ovlivňují funkce periferních orgánů. Oxytocin se v první řadě podílí na správné funkci mléčných žláz při laktaci a stimuluje kontrakce dělohy při porodu. Vazopresin se uplatňuje zejména při řízení míry reabsorpce vody v ledvinách a snižuje tak množství tvořené moči. Dále vazopresin stimuluje vazokonstriktvní cévy, čímž může regulovat krevní tlak [2]. Druhá, a méně prozkoumaná, je funkce hormonů centrálně přímo v hypotalamu, kde také dochází k jejich sekreci [3].

Skupina OT a ADH neuronů tvoří tzv. magnocelulární neurosekreční systém, jehož součástí jsou supraoptická a paraventrikulární jádra hypotalamu, odkud jsou z těl neuronů vysílány axony do neurohypofýzy. Anatomické umístění a schématické znázornění magnocelulárního neurosekrečního systému je znázorněno na obrázek 3.1.



Obrázek 3.1: Magnocelulární neurosekreční systém. A): Frontální řez mozku potkana v úrovni optického křížení (OX), obarvené supraoptické jádro (SON) je vyznačeno šipkou (obrázek převzat z [4]). B): Schématické znázornění vedení axonů magnocelulárních neuronů ze supraoptického jádra (SON) do neurohypofýzy.

Samotná sekrece vazopresinu a oxytocinu z axonálních terminálů v hypofýze probíhá díky Ca^{2+} řízené exocytóze [5]. Ta je spuštěna akčními potenciály generovanými v tělech neuronů v hypotalamu. Mechanizmus této přímé regulace je poměrně dobře popsán, méně

známý je ale mechanizmus a funkce lokální sekrece z dendritů neuronů přímo v hypotalamu. Takto vyloučené hormony neuplatňují svou periferní funkci, ale působí lokálně na samotné magnocelulární neurony, jež na svém povrhu specificky exprimují receptory pro ADH nebo OT [6]. Přesná funkce této autokrinní signalizační dráhy není doposud známa, nicméně existují důkazy o důležité roli při samotné regulaci sekrece hormonů [7].

Nedávno objevenou charakteristikou magnocelulárních (MC) neuronů jsou tzv. spontánní oscilace cytoplasmatické koncentrace vápníku ($[Ca^{2+}]_i$). Tyto oscilace se vyskytují v mnoha typech buněk a i přesto, že je známo, že Ca^{2+} samotný reguluje mnoho buněčných procesů, význam a funkce $[Ca^{2+}]_i$ oscilací doposud nejsou dobře objasněny [8]. Obecně se předpokládá, že $[Ca^{2+}]_i$ oscilace využívají určitou formu frekvenčního kódování signálů a slouží k přenosu informací a zároveň umožňují vyhnout se toxicitě Ca^{2+} způsobenou jeho dlouhodobě zvýšenou hladinou v buňce. Obecně jsou známy především dva typy oscilací na základě primárního zdroje Ca^{2+}. Tím je buď endoplasmické retikulum (ER), kdy k oscilacím dochází díky cyklickému výlevu Ca^{2+} z ER a jeho aktivnímu transportu zpět. Druhá, méně častá a také méně prozkoumaná varianta, využívá vtok Ca^{2+} z extracelulárního prostoru v kombinaci s extruzními mechanizmy, které Ca^{2+} aktivně odvání vně buňky. V případě MC neuronů není doposud objasněn fyziologický význam $[Ca^{2+}]_i$ oscilací a není ani znám mechanismus jejich vzniku.

MC neurony si vyvinuly charakteristické vlastnosti pro řízení sekrece hormonů, k čemuž využívají různé typy elektrické aktivity. OT neurony za běžných podmínek vykazují nízkou elektrickou aktivitu s frekvencí 2-4 akčních potenciálů (AP) za vteřinu. Je známo, že OT neurony během těhotenství absolvují změny, které zvýší jejich aktivitu a umožní stimulovat intenzivní sekreci OT, zejména během porodu pro řízení kontrakcí, a později během laktace. Při stimulaci laktace dochází k synchronizaci celé populace OT neuronů, které z nízké aktivity, na velmi krátkou dobu (2-5 sekund), přejdu do vysoké elektrické aktivity o frekvenci až 100 AP/s, umožňující prudký výlev OT do krevního sytému a stimulaci mléčných žláz [9].

ADH neurony jsou oproti OT neuronům aktivní neustále a svou aktivitu přizpůsobují nejen momentálnímu potřebě sekrece hormonu,

ale také předchozí sekreční aktivitě, díky čemuž je zabráněno rychlému vyčerpání omezených zásob hormonu. Na rozdíl od OT neuronů nejsou ADH neurony synchronizovány, naopak vykazují široké spektrum aktivity v rámci celé populace. Část neuronů je v klidu, se sporadickou elektrickou aktivitu 1-2 AP/s, část neuronů produkuje pravidelné akční potenciály okolo 5 AP/s a část neuronů vykazuje tzv. cyklickou (z anglického „phasic“) el. aktivitu, složenou z klidných period bez AP a period s vysokou frekvencí až 50 AP/s [10]. Klidná a aktivní perioda se střídají v intervalu desítek vteřin, přičemž bylo prokázáno, že právě tato cyklická aktivita umožňuje nejefektivnější sekreci ADH a věří se, že poměr cyklicky aktivních a ostatních neuronů v populaci je mechanismus jakým ADH neurony regulují aktivitu sekrece [11].

Dynamika Ca^{2+} hraje v magnocelulárních neuronech významnou roli neboť, i) sekrece hormonů je přímo řízena Ca^{2+}, ii) elektrická aktivita neuronů je regulována Ca^{2+} prostřednictvím Ca^{2+} řízených draslíkových kanálů, iii) samotné zvýšení vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} vede k sekreci hormonů z dendritů a tvoří tak zpětnovazební regulační mechanizmus. Předpokládá se, že vzájemné porozumění mezi el, aktivitou, fyziologií Ca^{2+} a lokální sekrecí je klíčem k objasnění komplexní funkce magnocelulárního neurosekrečního systému [7].

Důležitost Ca^{2+} je dána vzájemným propojením elektrické a vápníkové aktivity a lokální sekrecí hormonů jež dohromady tvoří složitý regulační systém, jehož funkce není doposud dostatečně popsána.

4 Hypotézy a cíle práce

V této dizertační práci jsem se zaměřil na Ca^{2+} dynamiku magnocelulárních neuronů potkanů, které je klíčová v centrální regulaci sekrece hormonů. Cílem práce bylo porozumět Ca^{2+} dynamice, generované jak spontánním vnitřním mechanismem neuronů, tak na Ca^{2+} dynamiku vyvolanou depolarizací neuronů. Dále jsem Ca^{2+} dynamiku studoval v situacích, kdy byly magnocelulární neurony vystaveny situacím napodobujícím specifické fyziologické stavy, kterým jsou za běžných okolností tyto buňky vystavovány *in vivo*.

4.1 Mechanizmy spontánních $[Ca^{2+}]_i$ oscilací

Na základě dřívějších publikací a našich pozorování ověřím hypotézu, že spontánní $[Ca^{2+}]_i$ oscilace magnocelulárních neuronů vychází z vnitřních mechanismů, které nevyžadují vnější podněty či stimuly. Jedním z hlavních cílů této práce je tedy identifikovat konkrétní mechanismy podíleních se na spontánních oscilacích a určit hlavní zdroj Ca^{2+}.

4.2 Ca^{2+} odpovědi vyvolané depolarizací

V dřívějších publikacích existuje nesoulad v popisu Ca^{2+} odpovědí magnocelulárních neuronů vyvolaných depolarizací. Obecný předpoklad, že depolarizace je čistě napěťově závislá nebyla v některých studiích potvrzena [3, 12]. Rozdíly v odpovědích byly přiřazovány buď nespecifické desenzitizaci vápníkových nebo draslíkových kanálů, případně se rozdíly vysvětlovali možnou odlišností mezi dvěma populacemi neuronů (ADH a OT). V této části práce chci potvrdit či vyloučit hypotézu, že variabilita depolarizací indukovaných Ca^{2+} odpovědí v magnocelulárních neuronech není striktně napěťově závislá a že je závislá na naplnění vnitrobuněčných Ca^{2+} zásobníků ER. Vycházím z předpokladu, že depolarizací vyvolané zvýšení koncentrace Ca^{2+} je důsledkem vtoku extracelulárního Ca^{2+} do buňky, doprovázeného uvolněním dalšího Ca^{2+} z ER. Různý stav naplnění ER tudíž může být příčina různě intenzivních odpovědí. Ke studiu tohoto jevu jsem vytvořil sérii experimentálních protokolů v kombinaci s výpočetní metodu, která umožňuje určit některé vnitřní toky Ca^{2+}, které nejsou běžnými postupy pozorovatelné.

Fyziologická role $[Ca^{2+}]_i$ oscilací v magnocelulárních neuronech

Spontánní $[Ca^{2+}]_i$ oscilace byly již dříve pozorovány v obou typech MC neuronů, nicméně jejich funkce či fyziologický význam nebyly doposud prostudovány [5, 13, 14]. V této části práce chci ověřit hypotézu, že tyto oscilace přímo či nepřímo reflektují fyziologický stav neuronů a že mohou přispět k regulaci sekrece. Ověřím dva typy situací: i) změny Ca^{2+} dynamiky během fyziologicky důležitých stavů jako jsou laktace a dehydratace, ii) momentální změny Ca^{2+} dynamiky při

vystavení akutní změně osmolarity a při simulaci lokální signalizace samotným vazopresinem.

Za tímto účelem vytvoříme metodiku pozorování a analýzy $[Ca^{2+}]_i$ oscilací, které nám umožní objektivně posuzovat výsledky. S využitím transgenních potkanů dále budeme studovat případné rozdíly v dynamice Ca^{2+} mezi identifikovanými OT a ADH neurony.

5 Materiály a metodika

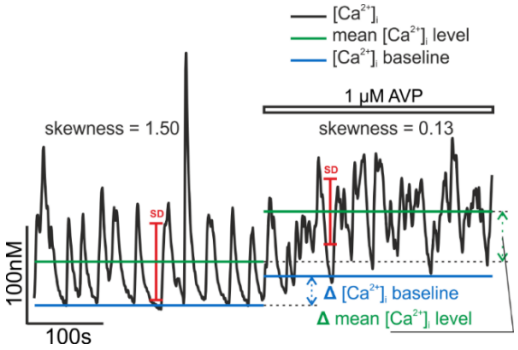
K pokusům jsme využívali výhradně dospělé potkany (4-8 týdnů) a to buď „wild“ type, nebo linii transgenních potkanů specificky exprimujících fluorescenčním proteinem značené hormony (AVP-eGFP, OT-mRFP1 nebo double AVP-eGFP/OT-mRFP). Transgenní potkani byly využívaní v pokusech, kde jsme určovali typ neuronu. Veškeré pokusy byly prováděny na izolovaných neuronech v podmínkách *in vitro*. Izolace neuronů byla prováděna uspáním potkanů isofluranem s následným usmrcením dekapitací. Z mozku potkana byla preparována tkáň supraoptického jádra (objem 1x1x1 mm v těsné blízkosti optického křížení) a neurony byly opatrně izolovány kombinací enzymatické a mechanické separace.

Vápníkové zobrazování bylo vždy prováděno s pomocí fluorescenčního indikátoru Fura-2 AM. Barvivo bylo aplikováno do misek s čerstvě izolovanými neurony po dobu 40 minut za pokojové teploty. Následně byly buňky několikrát omyty čistým roztokem (Normal Locke) a po dalších 20 minutách bylo zahájeno samotné vápníkové zobrazovaní.

K měření vápníkové koncentrace izolovaných neuronů jsme využívali mikroskopickou sestavu: ZEISS Axiso obserer D1, CCD kamera Zeiss MRm, ultrarychlý měnič vlnových délek Lambda D4. Fluorescenční signál indikátoru Fura 2-AM byl získáván periodickým excitováním buněk dvěma vlnovými délkami 340 nm a 380 nm, excitovaný fluorescenční signál byl následně zachytáván na vlnové délce 500 nm. Signál eGFP a mRFP1 byl získáván s pomocí příslušných excitačních a emisních filtrů. Aplikace roztoků byla prováděna počítačem řízenými peristaltickými pumpami s celkovou kapacitou 7 různých roztoků. Aplikační systém umožnoval přesnou a

rychlou výměnu roztoků v těsné blízkosti měřené buňky s minimální kontaminací jejího okolí.

Pro vyhodnocování spontánních oscilací jsme definovali 4 popisující parametry: standartní odchylka hodnot $[Ca^{2+}]_i$ (SD), aritmetický průměr hodnot $[Ca^{2+}]_i$ (mean), klidová hodnota $[Ca^{2+}]_i$ (baseline) a koeficient špičatosti distribuce hodnot $[Ca^{2+}]_i$ (skewness). Parametry jsou graficky definovány na obr 5.1.



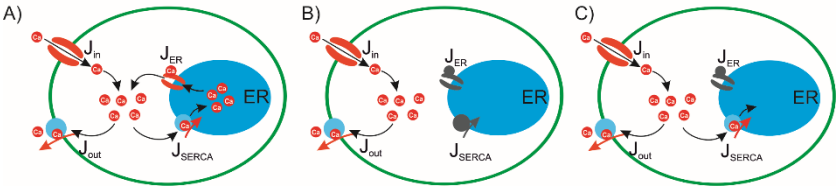
Obrázek 5.1: Definice parametrů použitých k hodnocení spontánních $[Ca^{2+}]_i$ oscilací.

Při analýze jednotlivých toků Ca^{2+} jsme využívali předpokladu, že vápníková odpověď neuronu na depolarizaci se skládá ze čtyř hlavních toků: depolarizací vyvolaný vtok J_{in}, extruzní Ca^{2+} transport vně buňky J_{out}, výtok Ca^{2+} z ER J_{er} a tok J_{serca}, reprezentující aktivní transport Ca^{2+} z cytoplazmy do ER. Tyto 4 toky (graficky znázorněné na obr. 5.2A) dohromady definují celkovou změnu vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} dc_i/dt:

$$dc_i/dt(t) = J_{in}(t) + J_{er}(t) - J_{serca}(t) - J_{out}(t). \quad (1)$$

V pokusech, kde jsme farmakologicky potlačili toky ER (obrázek 5.2B) se rovnice zjednodušila na pouhé dva toky J_{in} a J_{out}. Po konci depolarizačního stimulu je tok J_{out} odpovědný za návrat zvýšené intracelulární koncentrace Ca^{2+} na klidovou úroveň. Proložením křivky tohoto poklesu jsme tento tok J_{out} určili, a následně dopočetli tok J_{in}. Porovnáním depolarizačních odpovědí, při kterých jsme blokovali toky ER s odpověďmi, při kterých bylo ER plně zapojené, jsme následně

separovali vnitrobuněčné toky J_{er} a J_{serca} od již identifikovaných toků J_{in} a J_{out}. To nám umožnilo odhadnou podíl jednotlivých toků na průběhu depolarizační odpovědi.

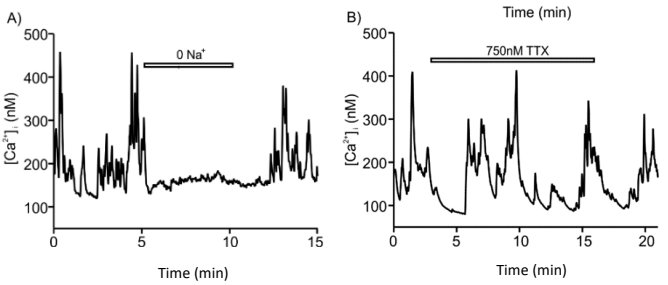


Obrázek 5.2: Toky podílející se na změnách intracelulární koncentrace Ca^{2+}. A) Normální stav buňky, změna $[Ca^{2+}]_i$ je dána součtem 4 základních toků, které nejsou rozlišitelné ze změřené odpovědi na depolarizaci. B) Stav buňky s farmakologicky potlačenými vnitrobuněčnými toky J_{er} a J_{serca}. Změna $[Ca^{2+}]_i$ je v takovém případě poháněna vtokem extracelulárního Ca^{2+} J_{in}, který je současně kompenzován opačným extruzním tokem J_{out}. C) Stav, kdy je tok J_{er} eliminován vyprázdněním vnitřních Ca^{2+} zásob ER. ER se tak na změnách $[Ca^{2+}]_i$ podílí pouze tokem J_{serca}, který odebírá část cytoplasmatického Ca^{2+} a ukládá jej do zásobníku ER.

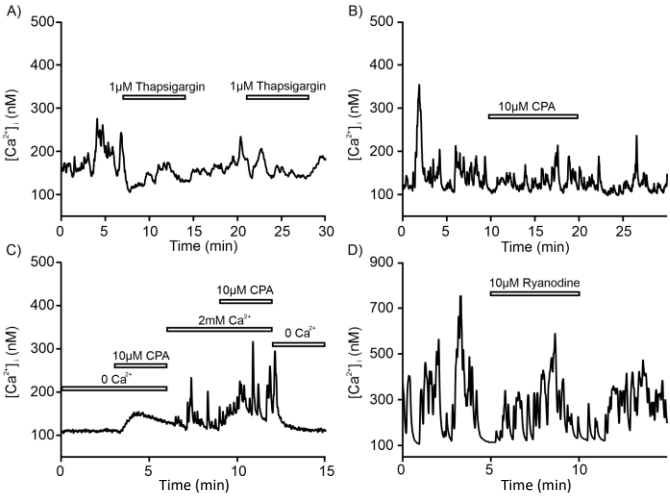
6 Výsledky

6.1 Mechanismy $[Ca^{2+}]_i$ oscilací.

Pro určení buněčných mechanizmů podílejících se na vzniku $[Ca^{2+}]_i$ oscilací jsme provedli rozsáhlý farmakologický screening. Využitím specifických antagonistů, agonistů a blokátorů jednotlivých Ca^{2+} mechanizmů jsme identifikovali, které z nich se primárně účastní vzniku oscilací. Při ověřování vazby oscilací na akční potenciály jsme určili, že $[Ca^{2+}]_i$ oscilace jsou potlačeny v roztoku s absencí Na^+, zároveň ale nedošlo k jejich potlačení při jejich vystavení blokátoru Na^+ kanálů, tetrodotoxinu (TTX) v testovaných koncentracích od 750 nM do 5 µM. (obrázek 6.1). Během ověřování role vnitrobuněčných vápníkových zásobníků endoplazmatického retikula nedošlo k viditelné změně oscilací při vystavení buněk Thapsigarginu a CPA, efektivním blokátorům SERCA pumpy ER, ani při vystavení caffeinu a ryanodinu, agonistům inositoltrisfosfátových a ryanodiových kanálů ER (obrázek 6.2).



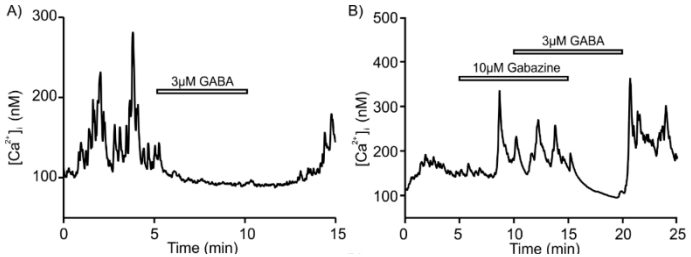
Obrázek 6.1: Podíl Na^+ kanálů a akčních potenciálů na vzniku $[Ca^{2+}]_i$. Oscilace byly efektivě potlačeny odebráním extracelulárního sodíku. Naopak blokátor sodíkových kanálů, Tetrodoxin (TTX) nebyl schopen oscilace potlačit ani jinak ovlivnit.



Obrázek 6.2: Role ER ve vzniku $[Ca^{2+}]_i$ oscilací. Žádná z testovaných látek, cílící na jednotlivé mechanizmy ER, nepotlačila, ani jinak výrazněji neovlivnila oscilace.

Jelikož role akčních potenciálů na vzniku oscilací byla vyloučena nulovým účinkem TTX, otestovali jsme, pro podrobnější prozkoumání napěťové závislosti oscilací, vliv neurotransmiterů. $[Ca^{2+}]_i$ oscilace byly efektivně a reverzibilně potlačeny inhibičním neurotransmiterem GABA, v koncentracích od 1 μM do 30 μM (obrázek 6.3A). Oscilace však byly zachovány při vystavení buněk neurotransmiteru GABA v kombinaci s antagonistou $GABA_A$ receptorů, Gabazinem (obrázek 6.3B). To indukuje zapojení napěťově

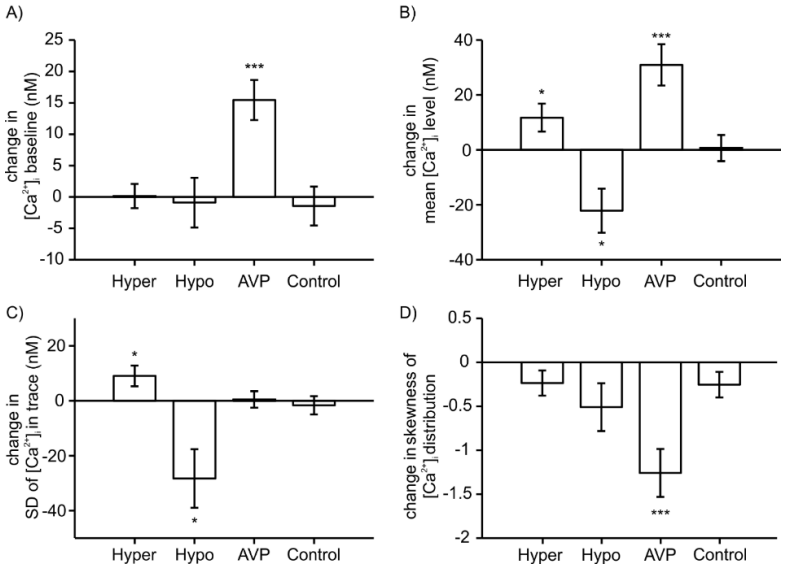
řízených receptorů typu $GABA_A$ a tudíž i napěťovou závislost $[Ca^{2+}]_i$ oscilací.



Obrázek 6.3: Role akčních potenciálů a neurotransmiterů při formování $[Ca^{2+}]_i$ oscilací

6.2 Fyziologie $[Ca^{2+}]_i$ oscilací

Studovali jsme $[Ca^{2+}]_i$ oscilace v podmínkách napodobujících fyziologické situace, kterým jsou tyto buňky ve svém prostředí vystavovány. Obrázek 6.4 ukazuje, jak akutní změna osmolarity ovlivňuje oscilující neurony. K hodnocení oscilací jsme využili 4 parametrů, uvedených v sekci metod (obrázek 5.1). Hypoosmolární roztok (275 mOsm/l) signifikantně snížil amplitudu oscilací a aritmetický průměr hodnot $[Ca^{2+}]_i$, zatímco hyperosmolární roztok (325 mOsm/l) měl účinek přesně opačný. Dále jsme oscilující neurony vystavili 1μM koncentraci samotného hormonu ADH, abychom imitovali autoregulační funkci ADH receptorů. ADH měl podobně excitační účinek jako hyperosmolární roztok, kdy taktéž zvýšil aritmetický průměr hodnotu $[Ca^{2+}]_i$. Na rozdíl od osmolarity, ale ADH neměnil amplitudu oscilací, změna průměru byla dosažena posunem basální hodnoty $[Ca^{2+}]_i$ (baseline). Na rozdíl od akutní změny osmolarity, pouze ADH signifikantně změnil parametr koeficientu špičatosti. Tento parametr reflektuje tvar $[Ca^{2+}]_i$ oscilací a spolu s odlišným způsobem, jakým ADH posouvá aritmetický průměr, ukazuje, že k modulaci oscilací v důsledku akutní změny osmolarity a vystavení ADH využívá buňka odlišný mechanizmus.

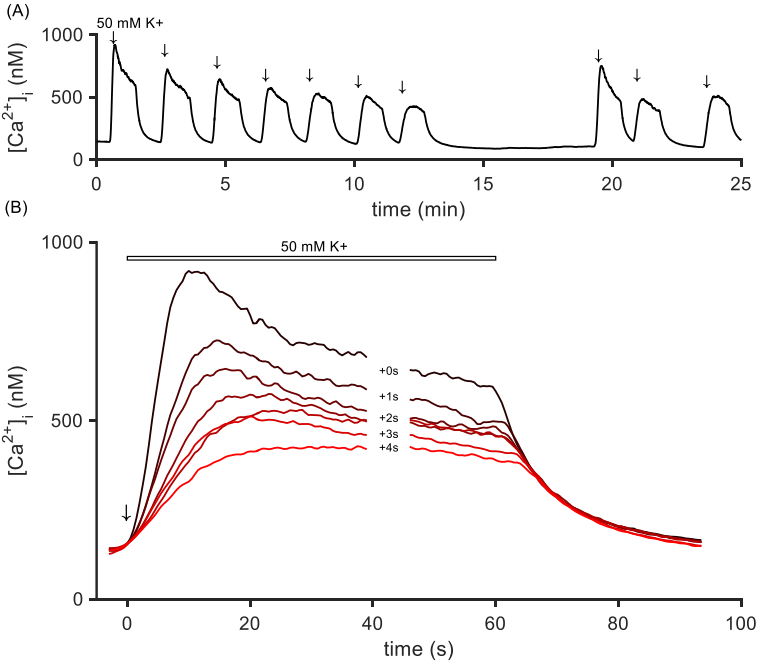


Obrázek 6.4: Vliv akutní změny osmolarity a autokrinní signalizace na $[Ca^{2+}]_i$ oscilace. Oscilace byly hodnoceny 4 parametry - panel A: basální koncentrace Ca^{2+} (baseline), panel B: aritmetická hodnota $[Ca^{2+}]_i$ (mean), panel C: standardní odchylka $[Ca^{2+}]_i$ (SD) a panel D: koeficient špičatosti distribuce hodnot $[Ca^{2+}]_i$. Testovali jsme změnu parametrů oscilujících neuronů při vystavení akutnímu stimulu, a to buď změnou osmolarity (hyper, hypo), vystavení 1 uM hormonu ADH (zde značeno jako AVP) a kontrolní měření bez stimulu (control). Sloupcová hodnota grafu vždy udává změnu parametru oscilace před a po provedení akutního stimulu buňky.

6.3 Dynamika depolarizací vyvolaných $[Ca^{2+}]_i$ odpovědí

Ke vtoku Ca^{2+} do buňky dochází typicky při depolarizaci membrány, která vede k otevření napěťově řízených Ca^{2+} kanálů. Tímto principem dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} i v MC neuronech během jejich cyklické elektrické aktivity. Vtok extracelulárního Ca^{2+} může být provázen dodatečným výlevem Ca^{2+} z ER mechanizmem zvaným CICR (Ca^{2+} induced Ca^{2+} release). Vzhledem k tomu, že elevace intracelulární koncentrace Ca^{2+} vede k lokální sekreci hormonů, je nezbytné mechanizmům depolarizací vyvolaných odpovědí detailně porozumět.

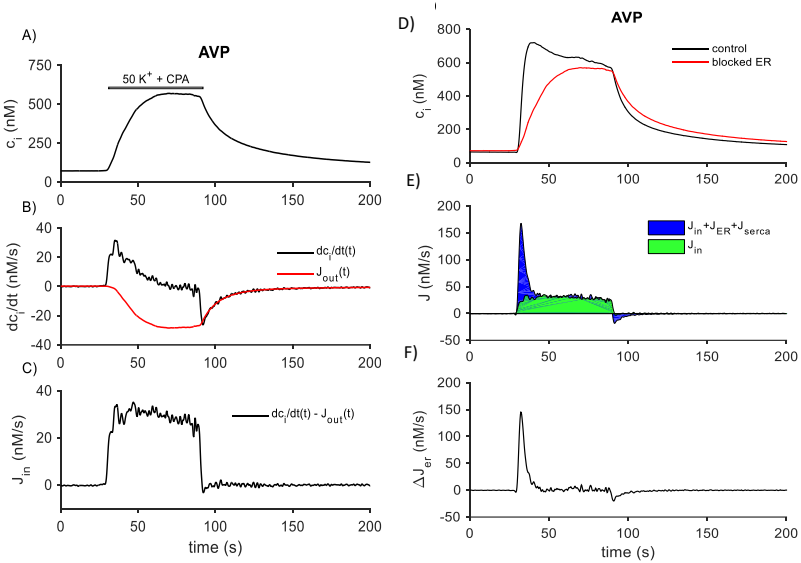
Série depolarizací evokovaných Ca^{2+} odpovědí na obrázku 6.5 ukazuje postupnou degradaci amplitudy odpovědí s každým opakováním. Avšak, jak je také vidět na obrázku 6.5, při dostatečně dlouhé pauze mezi dvěma depolarizacemi byly buňky schopny opětovně dosahovat původních intenzit odpovědí. Panel B ukazuje sérii odpovědí z panelu A, zarovnaných dle náběžné a sestupné části křivky. Vidíme, že nedochází pouze k degradaci amplitudy, ale i k poklesu rychlosti, s jakou odpověď dosahuje maxima během depolarizace. Sestupná část naopak nevykazuje výraznější změny a schopnost odčerpávat Ca^{2+} se během opakované depolarizace zřejmě nemění.



Obrázek 6.5: Opakované Ca^{2+} odpověď vyvolaná depolarizací

Z tohoto výsledku je možné se domnívat, že při opakované depolarizaci dochází k postupnému vyčerpání vnitrobuněčných zásob Ca^{2+} v ER a v důsledku toho dochází k redukci amplitudy odpovědí.

Pro podrobnější zkoumání, zda je degradace opravdu způsobena ER, jsme měřili buňky v podmínkách, kdy jsme farmakologicky potlačili některé Ca^{2+} mechanizmy. Na obrázku 6.6A je vidět typická odpověď získaná v podmínkách, kdy jsme před depolarizací nejprve vyprázdnili Ca^{2+} zásobníky ER a v průběhu depolarizace jsme zablokovali Ca^{2+} pumpu ER (SERCA). V ideálním případě se buňka dostane do stavu ilustrovaném na obrázku 5.2B a její odpověď na depolarizaci je tak způsobena pouze vtokem Ca^{2+} z extracelulárního prostoru J_{in}, kompenzovaného extruzním tokem J_{out}.



Obrázek 6.6: Separace Ca^{2+} toků.

Vnitrobuněčné toky J_{er} a J_{serca} se v tomto případě neuplatňují. Při depolarizaci do buňky začne vnikat Ca^{2+} a koncentrace Ca^{2+} roste do té doby, než je vykompenzována opačným tokem J_{out} a buňka dosáhne nové rovnováhy. Ve chvíli, kdy je ukončen depolarizační stimul, vtok J_{in} zaniká a převládající tok J_{out} navrátí $[Ca^{2+}]_i$ na klidovou úroveň. Díky tomu, že jsme potlačili vnitřní toky, bylo dále možné určit

extruzní tok J_{out}, a na jeho základě dopočíst zbývající tok J_{in}. Na panelu C je vidět tento dopočtený tok J_{in}, který má téměř obdélníkový průběh a je evidentně definován přítomností depolarizačního stimulu. Tok J_{in} je tedy jeví být řízený depolarizací způsobem on/off. Dále vidíme, že z přítomnosti depolarizačního stimulu nedochází k výraznějšímu poklesu velikosti toku a s velkou pravděpodobností tedy nedochází k desenzitizaci Ca^{2+} kanálů. Poslední panel F, na obrázku 6.6, reprezentuje celkový tok ER daný součtem opačných toků $J_{er} + J_{serca}$. Z průběhu tohoto celkového toku je vidět, že na začátku depolarizace dojde k prudkému výlevu Ca^{2+} z ER. Dále jsou toky J_{er} a J_{serca} v průběhu depolarizace vyrovnány (stejné množství Ca^{2+} teče do i z ER) a až po ukončení stimulu začne převládat tok J_{serca} směrem do ER.

V pokusech, kdy jsme neblokovali J_{serca}, ale pouze jsme vyprázdnili ER, došlo k ještě výraznému zeslabení odpovědí. To indikuje, že prázdné ER nejen že neposkytlo dodatečný Ca^{2+} pro strmou odpověď, ale naopak ER odebralo část Ca^{2+} z toky J_{in} a způsobilo tak ještě výraznější zeslabení odpovědi.

7 Diskuse

V první části práce jsme se zabývali mechanizmy spontánních $[Ca^{2+}]_i$ oscilací v izolovaných MC neuronech. Zde jsme zejména identifikovali Na^+/Ca^{2+} výměník, Ca^{2+} ATPázu plasmatické membrány (PMCA) a napěťové řízený Ca^{2+} kanál typu R, jako mechanizmy nezbytné ke vzniku a udržení oscilací. Specifická blokace jednoho z těchto mechanizmů vedla k inhibici oscilací. Dále jsme prokázali, že tyto oscilace nejsou závislé na akčních potenciálech, neboť vystavení oscilujících buněk blokátoru Na^+ kanálů Tetrodotoxinu nemělo na oscilace viditelný efekt. Na druhou stranu jsme ukázali, že změna membránového potenciálu je pro oscilace s největší pravděpodobností nezbytná, neboť oscilace byly reverzně inhibovány blokováním $GABA_A$ receptorů. Naše hypotéza oscilací je taková, že v neuronech dochází k cyklické změně membránového potenciálu, která je ovšem vzdálena od prahu potřebného k vzniku akčního potenciálu. Malá změna membránového potenciálu však může přepnout Na^+/Ca^{2+} do reverzního módu [15], což by přispělo k rychlému nárusty Ca^{2+}

koncentrace. S narůstajícím koncentrací Ca^{2+} se práh reverzního módu Na^{+}/Ca^{2+} výměníku posouvá, a při dosažení určitého rovnovážného stavu mezi hodnotou membránového potenciálu a koncentrací Ca^{2+} se výměník přepne zpět do normálního módu. Na^{+}/Ca^{2+} opět začne Ca^{2+} odebírat z buňky, což má za následek pokles koncentrace Ca^{2+}. $[Ca^{2+}]_i$ oscilace založené na podobném mechanizmu již byli popsány, ačkoliv se nejednalo o excitabilní buňky [16]. Nezávislost akčních potenciálů a oscilací může mít významnou roli v regulaci sekrece, nicméně způsob koordinace těchto dvou různorodých fyziologických mechanizmů a jejich podíl na regulaci nám doposud znám není.

V druhé části jsme, na rozdíl od spontánní Ca^{2+} aktivity z první části, studovali aktivitu MC neuronů vyvolanou depolarizací. Cílem bylo za prvé: odpovědět na několik nejasností vyplývajících z literatury ohledně vztahu depolarizace membrány a Ca^{2+} odpovědí a za druhé získat detailní matematický popis těchto odpovědí. Cílenými experimenty jsme vyvrátili předpoklad, že odpověď na depolarizaci je striktně napěťově závislá. Odpovědi na stejný depolarizační stimul vykazovaly silnou míru nepředvídatelnosti. V praxi docházelo k tomu, že neuron může na stejný stimul odpovědět velmi rychlým a intenzivním nárůstem Ca^{2+} s typickým „zákmitem“ na samém počátku odpovědi, ale také výrazně pomaleji. Cílené pokusy s opakovanými odpověďmi a různou mírou depolarizace ukázali, že kromě závislosti na síle depolarizace se v odpovědích projevuje další element, výrazně závislý na předešlé aktivitě neuronů. Z dřívějších pozorování jsem měl hypotézu, že elementem způsobujícím různé odpovědi na stejný depolarizační stimulus je míra naplnění ER. Je známo, že v mnoha typech buněk může ER rychle a krátkodobě zvýšit $[Ca^{2+}]_i$ mechanizmem zvaným CICR (Ca^{2+}-induced-Ca^{2+}-release). S využitím známých postupů jsme proto měřili Ca^{2+} odpovědi v podmínkách, kdy jsme ovlivňovali funkci ER. Ukázalo se, že blokování ER (jak výlev z ER, tak re-akumulaci do ER) vedla k výraznému zpomalení odpovědí a jejich sjednocení, co se amplitudy a tvaru odpovědí týče. Analýzou změřených odpovědí se nám podařilo separovat odpovědi do jednotlivých toků, které ilustrativně ukazují podíl ER na vzniku depolarizační odpovědi (obrázek 6.6E). V pokusu, kdy bylo ER před stimulem vyprázdněno došlo k ještě výraznějšímu zpomalení odpovědí, což indikuje, že prázdné ER nejenže nijak nepřispívá k nárůstu

koncentrace Ca^{2+}, ale naopak jej pomocí SERCA pump výrazně zpomaluje. Tato role ER může mít dopad na vznik cyklické aktivity zejména ADH neuronů. Je známo, že nárůst $[Ca^{2+}]_i$ způsobuje hyperpolarizaci a tudíž brání vzniku akčních potenciálů potřebných k cyklické aktivitě [17]. To by znamenalo, že pro přechod z klidové do cyklické aktivity by neuron vyžadoval intenzivní a dlouhodobou stimulaci, která postupně vyprázdní ER, v důsledku čehož již nebude neuron schopen potlačit nárůst membránového potenciálu což umožní přechod do cyklické elektrické aktivity.

V poslední části jsme pozorovali chování oscilujících neuronů v podmínkách napodobujících některé fyziologické situace, kterým tento typ buněk musí běžně čelit. Ukázali jsme, že izolované oscilující MC buňky přímo reflektují změnu osmolarity a přinášíme tak další důkaz toho, že tyto buňky disponují mechanizmem pro vnímání osmolarity a nejsou tudíž pouze řízené aferentním vstupem osmosenzitivnéh buněk. Dále jsem pozorovali, že spontánní $[Ca^{2+}]_i$ oscilace jsou zachovány v buňkách potkanů vystavených dehydrataci a v buňkách potkanů samic ve fázi aktivní laktace. Viditelnou změnu v charakteristice $[Ca^{2+}]_i$ oscilací, přiřaditelnou k těmto stavům jsme však nepozorovali. Důležitým výsledkem bylo prokázání modulačního efektu samotného hormonu ADH na oscilující buňky. Nejenže jsme ukázali, že ADH má excitační účinek na spontánní $[Ca^{2+}]_i$ aktivitu, ale ukázali jsme také, že mechanizmus, kterým je tato modulace dosažena, musí být rozdílný od mechanizmu, kterým jsou oscilace ovlivňovány při vystavení neuronů akutní změně osmolarity.

Tato práce ukazuje důležité poznatky ohledně role Ca^{2+} dynamiky magnocelulárních neuronů, jejíž další důkladné studování v *in vivo* podmínkách bude nezbytné k plnému porozumění tohoto komplexního regulačního systému.

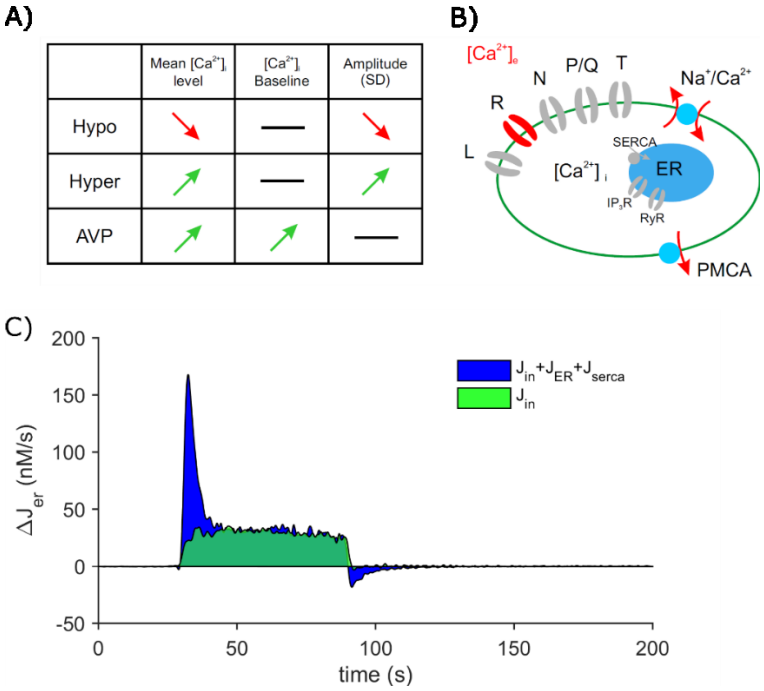
8 Závěr

Zde bych chtěl v krátkosti zvýraznit nejdůležitější výsledky této práce. Ukázali jsme, že ADH a OT neurony v izolovaných podmínkách běžně vykazují $[Ca^{2+}]_i$ oscilace, které jsou spontánní a vychází čistě z vnitrobuněčných Ca^{2+} mechanizmů, bez potřeby vnějšího zdroje

rytmu. $[Ca^{2+}]_i$ oscilace byly zachovány i v buňkách izolovaných z potkanů ve stavu laktace a dehydratace. Tabulka na obrázku 8.1A shrnuje, jak tyto oscilace reflektují akutní změny osmolarity a jak jsou modulovány lokální stimulací vazopresinem.

Dále jsme určili hlavní Ca^{2+} mechanizmy, které jsou nezbytné ke vzniku těchto oscilací. Jsou jimi Na^+/Ca^{2+} výměník, Ca^{2+} pumpa plasmatické membrány (PMCA) a napěťově řízený Ca^{2+} kanál typu R. Výsledek je graficky znázorněn na obr 8.1B.

Demonstrovali jsme specifickou roli endoplazmatického retikula, které se sice neuplatňuje v spontánních $[Ca^{2+}]_i$ oscilacích, ale má schopnost výrazně měnit dynamiku Ca^{2+} odpovědí vyvolaných depolarizací. Intenzita odpovědi je silně ovlivněna stavem naplnění Ca^{2+} zásobníků ER. Zatímco naplněné ER může výrazně zesílit odpověď na stejně silný depolarizační stimulus, prázdné ER může naopak odpověď významně zeslabit. Obrázek 8.1C ilustruje jak se na odpovědi podílí depolarizací vyvolaný vtok J_{in} (zeleně) doplněný o krátkodobé, ale výrazné, uvolnění Ca^{2+} z ER (zeleně).



Obrázek 8.1: Shrnutí významných výsledků práce. A) Modulace spontánních $[Ca^{2+}]_i$ oscilací akutní změnou osmolarity a stimulací vazopresinem. Šipky indikují inhibiční (dolů) nebo excitační (nahoru) účinek, horizontální čára indikuje nulový účinek. B) Schématické znázornění mechanizmů identifikovaných jako nezbytných ke vzniku $[Ca^{2+}]_i$ oscilací v magnocelulárních neuronech. Jsou jimi Na^+/Ca^{2+} výměník, Ca^{2+} pumpa plasmatické membrány (PMCA) a napěťově řízený Ca^{2+} kanál typu R. C) Ukázka průběhu Ca^{2+} toků, podílejících se na depolarizací vyvolaných Ca^{2+} odpovědích. Zelená plocha značí samotný depolarizací vyvolaný vtok J_{in}, určený v podmínkách, kdy byli farmakologicky potlačeny toky endoplazmatického retikula. Modrá plocha značí kombinaci tohoto toku J_{in} doplněného o toky endoplazmatického retikula J_{er} a J_{serca}, získaných za normálních podmínek

9 Použitá literatura

1. Brown, C.H., et al., *Physiological Regulation of Magnocellular Neurosecretory Cell Activity: Integration of Intrinsic, Local and Afferent Mechanisms.* Journal of Neuroendocrinology, 2013. **25**(8): p. 678-710.
2. Bourque, C.W. and S.H.R. Oliet, *Osmoreceptors in the central nervous system.* Annual Review of Physiology, 1997. **59**: p. 601-619.
3. Komori, Y., et al., *Ca(2+) homeostasis, Ca(2+) signalling and somatodendritic vasopressin release in adult rat supraoptic nucleus neurones.* Cell Calcium, 2010. **48**(6): p. 324-32.
4. Mutsuga, N., et al., *Selective gene expression in magnocellular neurons in rat supraoptic nucleus.* Journal of Neuroscience, 2004. **24**(32): p. 7174-7185.
5. Dayanithi, G., et al., *Segregation of calcium signalling mechanisms in magnocellular neurones and terminals.* Cell Calcium, 2012. **51**(3-4): p. 293-9.
6. Ludwig, M., et al., *Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites.* Nature, 2002. **418**(6893): p. 85-9.
7. Ludwig, M., et al., *Regulation of activity-dependent dendritic vasopressin release from rat supraoptic neurones.* J Physiol, 2005. **564**(Pt 2): p. 515-22.
8. Keener, J. and J. Sneyd, *Mathematical Physiology I: Cellular Physiology*. 3st ed. 2009, New York: Springer.
9. Armstrong, W.E., *The neurophysiology of neurosecretory cells.* Journal of Physiology-London, 2007. **585**(3): p. 645-647.
10. Armstrong, W.E., *Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons.* Progress in Neurobiology, 1995. **47**(4-5): p. 291-339.
11. MacGregor, D.J. and G. Leng, *Phasic Firing in Vasopressin Cells: Understanding Its Functional Significance through Computational Models.* Plos Computational Biology, 2012. **8**(10).
12. Sabatier, N., P. Richard, and G. Dayanithi, *L-, N- and T- but neither P- nor Q-type Ca2+ channels control vasopressin-induced Ca2+ influx in magnocellular vasopressin neurones isolated from the rat supraoptic nucleus.* J Physiol, 1997. **503 (Pt 2)**: p. 253-68.
13. Lambert, R.C., et al., *A rise in the intracellular Ca2+ concentration of isolated rat supraoptic cells in response to oxytocin.* J Physiol, 1994. **478 (Pt 2)**: p. 275-87.
14. Dayanithi, G., N. Sabatier, and H. Widmer, *Intracellular calcium signalling in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus: understanding the autoregulatory mechanisms.* Exp Physiol, 2000. **85 Spec No**: p. 75S-84S.
15. Brustovetsky, T., et al., *KB-R7943, an inhibitor of the reverse Na+/Ca2+exchanger, blocks N-methyl-D-aspartate receptor and inhibits mitochondrial complex I.* British Journal of Pharmacology, 2011. **162**(1): p. 255-270.
16. Kawano, S., et al., *Ca2+ oscillations regulated by Na+-Ca2+ exchanger and plasma membrane Ca2+ pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells.* Cell Calcium, 2003. **34**(2): p. 145-156.
17. Greffrath, W., et al., *Components of after-hyperpolarization in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus in vitro.* J Physiol, 1998. **513 (Pt 2)**: p. 493-506.

10 Seznam publikací

I. Kortus, Stepan & Chinnapaiyan, Srinivasan & Forostyak, Oksana & Zapotocky, Martin & Ueta, Yoichi & Syková, Eva & Chvátal, Alexandr & Verkhratsky, Alexei & Dayanithi, Govindan. (2016). Sodium-calcium exchanger and R-type Ca2+ channels mediate spontaneous [Ca2+]i oscillations in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus. Cell Calcium. 59. 289-298. 10.1016/j.ceca.2016.03.010. IF: 3.707 (2016).

II. Kortus, Stepan & Chinnapaiyan, Srinivasan & Forostyak, Oksana & Ueta, Yoichi & Syková, Eva & Chvátal, Alexandr & Zapotocky, Martin & Verkhratsky, Alexei & Dayanithi, Govindan. (2016). Physiology of spontaneous [Ca2+]i oscillations in the isolated vasopressin and oxytocin neurones of the rat supraoptic nucleus. Cell Calcium. 59. 280-288. 10.1016/j.ceca.2016.04.001. IF: 3.707 (2016).

III. Forostyak, Oksana & Forostyak, Serhiy & Kortus, Stepan & Syková, Eva & Verkhratsky, Alexei & Dayanithi, Govindan. (2016). Physiology of Ca2+ signalling in stem cells of different origins and differentiation stages. Cell Calcium. 59. 57-66. 10.1016/j.ceca.2016.02.001. IF: 3.707 (2016).