



Doctoral Thesis

Calcium dynamics in cerebellar Purkinje cells

Author(s):

Vranesic, Ivan Toma

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000666158> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Calcium Dynamics in Cerebellar Purkinje Cells

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
IVAN TOMA VRANESIC

Dipl. phys. ETH
born September 22, 1964

citizen of Basel/BS

accepted on the recommendation of
Prof. Klaus Hepp, examiner
Prof. Beat H. Gähwiler, co-examiner

1992



Cat 8

Summary

In neurons, an elevation of the cytosolic Ca^{2+} concentration can be generated by two distinct processes: by inflow of Ca^{2+} ions across the plasma membrane through Ca^{2+} channels, or via release of Ca^{2+} from inositol-(1,4,5)-trisphosphate (IP_3)-sensitive intracellular Ca^{2+} stores. Cerebellar Purkinje cells possess dendritically located voltage-gated Ca^{2+} channels and have IP_3 -sensitive intracellular Ca^{2+} stores. The use of the fluorescent Ca^{2+} indicator fura-2 as a probe for intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), in combination with microfluorometric techniques and intracellular recording with microelectrodes, allowed us to study the relations between Ca^{2+} signaling and electrical activity of these neurons.

A charge-coupled device camera and a photodiode array were utilized to monitor fura-2 fluorescence with high spatial resolution and high temporal resolution, respectively. To obtain the distribution and time course of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a quantitative way from fura-2 fluorescence signals, two techniques were used. The 'ratio method' was used for the study of Ca^{2+} signals with a temporal resolution in the second range. In order to measure fast Ca^{2+} signaling in the millisecond range, an alternative approach, based on the 'ratio method', was developed and applied.

The present thesis describes properties of synaptically and chemically evoked Ca^{2+} signals in cerebellar Purkinje cells. The mechanisms involved in the generation of synaptically induced climbing fibre responses and the concomitant elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Purkinje cells were studied in a co-culture system of inferior olive and cerebellar cortex. Activation of climbing fibres by electrical stimulation induced a typical depolarizing response of Purkinje cells, the complex spike, that was accompanied by a fast rise in dendritic $[\text{Ca}^{2+}]_i$. We tested whether activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs), one subtype of which (mGluR₁) is known to cause IP_3 -mediated Ca^{2+} release in

other preparations, was involved in the generation of the Ca^{2+} signal. To answer this question, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), a blocker of (RS)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-sensitive receptors, but not of mGluRs, was used. In presence of CNQX, the complex spike and the concomitant Ca^{2+} signal were completely abolished. This observation led us to conclude that the Ca^{2+} signal is generated exclusively via the activation of voltage-gated Ca^{2+} channels in response to the AMPA receptor-mediated membrane depolarization.

To investigate the effects of mGluR activation in slice-cultured Purkinje cells, the selective agonist of these receptors, trans-D,L-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid (t-ACPD), was used. In Purkinje cells of acute cerebellar slices, the t-ACPD-induced Ca^{2+} signal was predominantly located in the soma, whereas depolarization-induced Ca^{2+} signals were most pronounced at the dendritic level. The somatic location of the t-ACPD-induced Ca^{2+} signal and the lack of a mGluR-mediated dendritic Ca^{2+} signal seen with climbing fibre activation suggest that mGluRs linked to Ca^{2+} release are located in the somatic membrane of Purkinje cells.

Apart from the generation of a Ca^{2+} signal, t-ACPD gave rise to membrane currents which were studied in detail in slice-cultured Purkinje cells. Application of t-ACPD to Purkinje cells voltage-clamped near their resting potential gave rise to an inward current, that was followed by a slow outward current. The inward current arose in parallel to the t-ACPD-induced Ca^{2+} signal and was investigated in a concurrent study (Staub et al., 1992).

The t-ACPD-induced outward current was characterized by a decrease in membrane conductance, a linear current-voltage relationship in the range from -130 to -60 mV and extrapolated reversal potential above 0 mV. These

findings indicated that the t-ACPD-induced outward current is due to a transient inhibition of a persistent inward current. Furthermore, the outward current was not suppressed in low external Na^+ and seemed to be occluded by the inorganic Ca^{2+} channel blocker Co^{2+} . These observations are consistent with the hypothesis that the t-ACPD-induced outward current is generated by a transient inhibition of a Ca^{2+} leak current. The t-ACPD-induced outward current was suppressed by buffering changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicating that the t-ACPD-induced Ca^{2+} signal was required for the induction of the current. Since caffeine has been reported to affect IP_3 -mediated Ca^{2+} release mechanisms, we tested whether the time course of the Ca^{2+} signal, and possibly the time course of the outward current could be affected by this substance. Application of t-ACPD in the presence of caffeine gave rise to outward currents that were enhanced in amplitude. This enhancement, however, was not accompanied by an alteration of the t-ACPD-induced Ca^{2+} signal. The effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine, an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterases on the t-ACPD-induced outward current were comparable to those of caffeine, suggesting that cyclic nucleotides might be involved in the generation of the current. Recently a novel mGluR subtype, termed mGluR₂, has been described, which is linked to the cyclic adenosine monophosphate signaling pathway. In view of the possible involvement of cyclic adenosine monophosphate in the induction of the outward current, it is tempting to propose that activation of mGluR₂s is involved in the induction of the t-ACPD-induced outward current.

Summary

Zusammenfassung

Die Kalziumkonzentration im Zytosol von Nervenzellen kann auf zwei prinzipiell verschiedene Weisen erhöht werden. Einerseits können Ca^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} -Kanäle vom Extrazellulärraum in das Zytosol einströmen, andererseits kann Ca^{2+} von intrazellulären Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP_3)-sensitiven Ca^{2+} -Speichern ausgeschüttet werden. Purkinje-Zellen im Kleinhirn besitzen sowohl dendritisch lokalisierte spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, als auch intrazelluläre IP_3 -sensitive Ca^{2+} -Speicher. Um den Zusammenhang zwischen elektrischer Aktivität und Ca^{2+} -Signalen dieses Zelltyps zu untersuchen, wurden intrazelluläre Ableitetechniken mit mikrofluorometrischen Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unter Verwendung des fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikators fura-2 kombiniert.

Für räumlich hochaufgelöste Fluoreszenzmessungen wurde eine CCD-Kamera (charge-coupled device) verwendet. Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung wurden mittels einer quadratischen Anordnung von 100 Photodioden ausgeführt. Quantitative Analysen der räumlichen Verteilung und des Zeitverlaufes von Ca^{2+} -Signalen wurden mittels zweier Methoden aus fura-2-Fluoreszenzsignalen gewonnen. Die allgemein gebräuchliche Fluoreszenzintensitätsquotienten-Methode ('ratio method') wurde für Untersuchungen von Ca^{2+} -Signalen im Sekundenbereich verwendet, während für quantitative Messungen der Ca^{2+} -Dynamik im Millisekundenbereich eine neue Methode entwickelt und angewendet wurde.

In der vorliegenden Arbeit sind Eigenschaften von synaptisch und chemisch induzierten Ca^{2+} -Signalen zerebellärer Purkinje-Zellen beschrieben. Synaptisch induzierte Kletterfaserantworten und die einhergehenden Ca^{2+} -

Signale wurden in Purkinje-Zellen aus olivo-zerebellären Co-Kulturen untersucht. Elektrische Reizung von Kletterfasern rief ein charakteristisches depolarisierendes Potential und einen raschen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Dendriten hervor. Wir prüften, ob Aktivierung sogenannter metabotroper Glutamat-Rezeptoren (mGluR_1), von denen bekannt ist, dass sie zu IP_3 -abhängiger Ausschüttung von Ca^{2+} führen können, zum Ca^{2+} -Signal beiträgt. Um diese Frage zu beantworten, wurden (RS)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat (AMPA)-sensitive Rezeptoren mittels des selektiven Antagonisten 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX) blockiert. Sowohl die Kletterfaserantwort, als auch das einhergehende Ca^{2+} -Signal wurden in Gegenwart von CNQX vollständig unterdrückt. Diese Beobachtung liess den Schluss zu, dass das Ca^{2+} -Signal ausschliesslich durch Aktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle zustande kommt, welche im Zuge der durch AMPA-Rezeptoren hervorgerufenen Depolarisation geöffnet werden.

Um die von metabotropen Glutamat-Rezeptoren vermittelten Effekte zu untersuchen, verwendeten wir $\text{trans}(\pm)$ -1-amino-1,3-cyclopentandicarboxylat (t-ACPD), einen spezifischen Agonisten solcher Rezeptoren. In Purkinje-Zellen aus akuten Schnitten des Kleinhirns führte Applikation von t-ACPD zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese Ca^{2+} -Signale waren besonders ausgeprägt im Soma, während Ca^{2+} -Signale, welche durch direkte Depolarisation ausgelöst wurden, deutlich dendritisch lokalisiert waren. Die somatische Lokalisation des t-ACPD-induzierten Ca^{2+} -Signals und die Beobachtung, dass Aktivierung metabotroper Glutamat-Rezeptoren kein dendritisches Signal zur Folge hatte, legen den Schluss nahe, dass metabotrope Glutamat-Rezeptoren, deren Aktivierung zu einer

Ausschüttung von Ca^{2+} führt, in der somatischen Membran von Purkinje-Zellen lokalisiert sind.

Es zeigte sich, dass t-ACPD neben einem Ca^{2+} -Signal auch Membranströme induzierte. Diese wurden in Gewebekulturen des Kleinhirns charakterisiert. Applikation von t-ACPD an spannungsgeklemmte (voltage-clamped) Purkinje-Zellen rief einen Einwärtsstrom hervor, welcher von einem langsameren Auswärtsstrom gefolgt wurde. Der mit den Ca^{2+} -Signal einhergehende Einwärtsstrom wurde in einer parallelen Arbeit untersucht (Staub et al., 1992).

Der t-ACPD-induzierte Auswärtsstrom war durch eine Abnahme der Membranleitfähigkeit und eine lineare Strom-Spannungskennlinie zwischen -130 und -60 mV gekennzeichnet, das extrapolierte Umkehrpotential lag über 0 mV. Diese Eigenschaften deuteten darauf hin, dass dieser Strom durch eine transiente Inhibition eines tonischen Einwärtsstromes erzeugt wurde. Unsere Beobachtung, dass der Strom durch Erniedrigung der externen Na^{+} -Konzentration nicht unterdrückt werden konnte und durch den anorganischen Ca^{2+} -Kanalblocker Co^{2+} okkludiert zu sein schien, sind konsistent mit der Hypothese, dass der Auswärtsstrom durch Inhibition eines tonischen Ca^{2+} -Stromes zustandekommt. Da der Strom durch das Puffern von Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unterdrückt werden konnte, schien das t-ACPD-induzierte Ca^{2+} -Signal ein für die Induktion des Stromes notwendiges Signal darzustellen. Da Koffein IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Ausschüttung beeinflussen kann, versuchten wir, ob mit Hilfe dieser Substanz der Zeitverlauf des t-ACPD-induzierten Ca^{2+} -Signals, und somit möglicherweise der Zeitverlauf des Auswärtsstromes verändert werden könnte. In Gegenwart von Koffein wurden grössere Auswärtsströme beobachtet. Diese Verstärkung war jedoch

nicht von einer Änderung des Zeitverlaufs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration begleitet. Die Wirkung des Phosphodiesterase-Hemmers 3-Isobutyl-1-methylxanthin auf den Auswärtsstrom war mit derjenigen von Koffein vergleichbar. Dies liess vermuten, dass zyklische Nukleotide an der Induktion des Stromes beteiligt sein könnten. Tatsächlich sind vor kurzem metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR_2) beschrieben worden, deren Aktivierung die Produktion von zyklischem Adenosin-monophosphat beeinflussen kann. Es ist vorstellbar, dass diese neuartigen metabotropen Rezeptoren an der Generation des Auswärtsstromes beteiligt sein könnten.