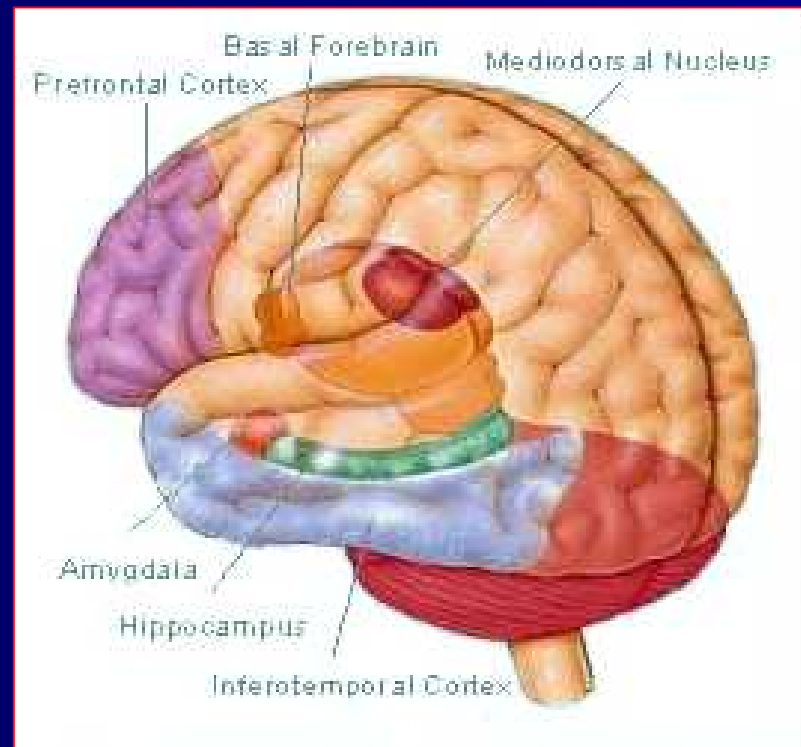


Paměťové stopy - engramy



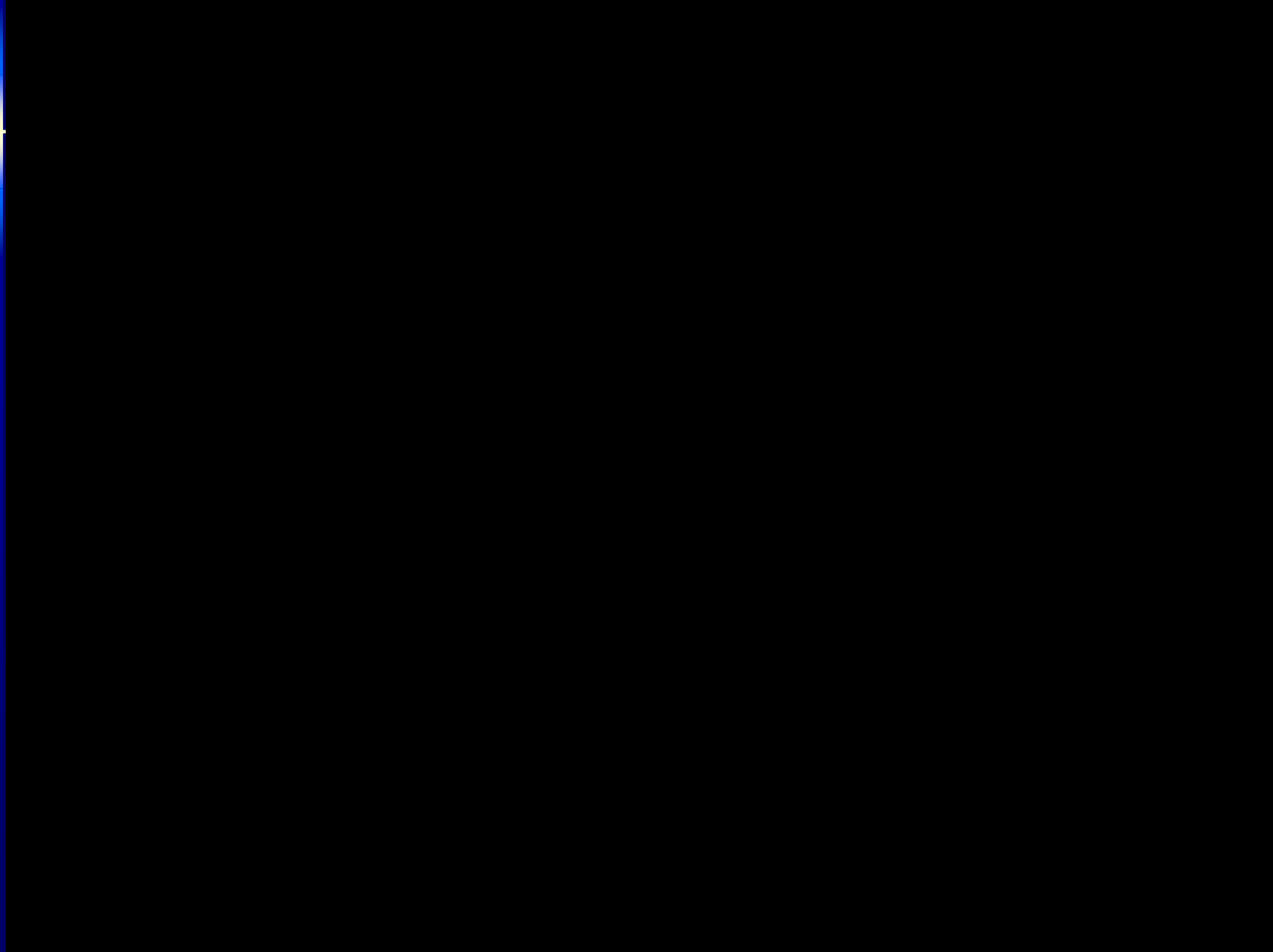
Obsah přednášky

- V této přednášce se budeme zabývat paměťovými stopami - **ENGRAMY**, jejich povahou, a některými fenomény s nimi spojenými
- Částečně si zopakujeme látku s přednášky č. **2**, která pojednávala o **mechanismech paměti**

Engram – paměťová stopa

- Tento pojem (navržený Richardem Semonem v r. 1921) značí hypotetický mechanismus jímž je uchována v paměti informace.
- *Semon, R. (1921), The Mneme. London: George Allen & Unwin*
- **Alternativně** může také značit vzpomínku, „kousek“ informace v paměti
- **Richard Semon** – německý zoolog a evoluční biolog, nepříliš známý, ale jeho myšlenky byly velmi vlivné
- Semon prosazoval koncept, že mentální stavy jsou zprostředkovány změnami v nervové činnosti
- Paměťová stopa není zpravidla lokalizována na jednom místě, ale je často distribuována v mozkových okruzích v podobě změn v synaptické plasticitě, které vedou ke změně neuronální funkce, potažmo s pozorovatelné změně v chování

Engram a synapse



Lashleyho hledání engramu



- Karl Spencer Lashley (1890–1958), byl americký psycholog a behaviorista, který byl ovlivněn behavioristou Johnem B. Watsonem
- Pokoušel se hledat, kde by engram mohl v mozku být lokalizován, a to za pomoci metody, kdy zvířata trénoval v různých úlohách (*brightness discrimination* a různá bludiště) a následně jim chirurgicky odnímal části mozkové kůry, a sledoval jak se jejich chování změnilo (povšimněte si, že tento koncept je v podstatě modifikován dodnes).
- Lashley ve hledání engramu neuspěl, nepodařilo se mu najít konkrétní strukturu, která by odpovídala za chování v těchto bludištích. Jeho zjištění postavilo teoretický rámec pro koncept distribuované paměťové stopy
- Lashleyho nálezy naznačovaly, že čím větší byl objem odňaté mozkové kůry, tím bylo poškození chování větší, ale že příliš nezáleželo na tom, kterou část kůry odejmul

Lashleyho principy

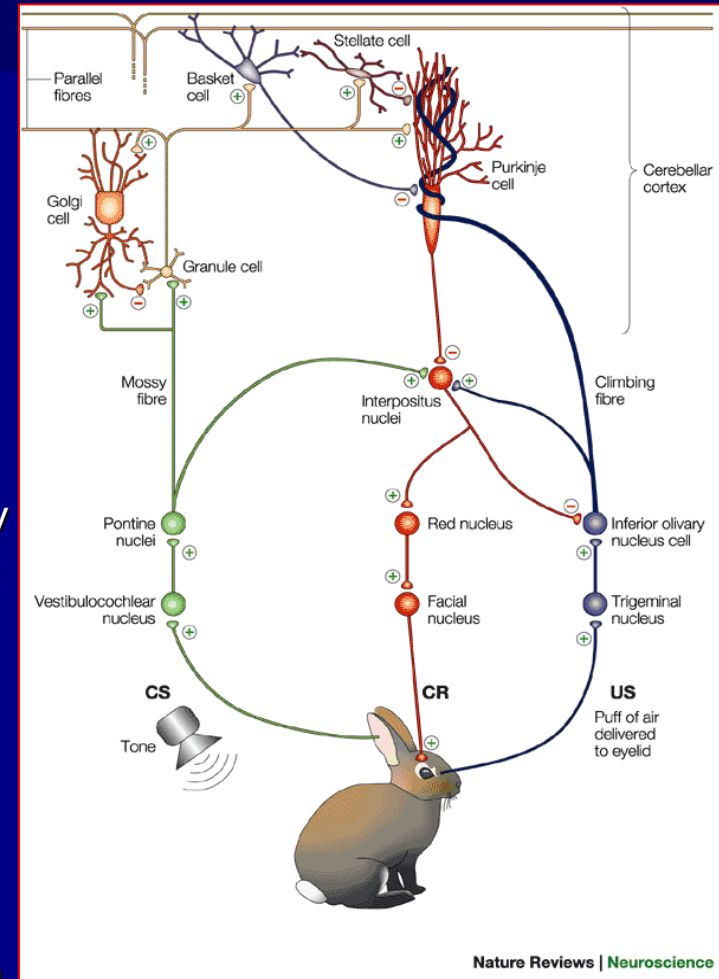
- **V roce 1950** shrnul Lashley 30 let svého bádání do dvou principů (*K. Lashley. In search of the engram. Symposia of the Society for Experimental Biology, 4:454-482, 1950*)
- **Princip ekvipotenciality** (Equipotentiality Principle) – po odstranění jedné korové oblasti může jiná oblast kortexu nahradit funkci té odstraněné, tzn. že by ve finále nezáleželo na tom, kde je léze provedena
- **Princip vlivu objemu** (The Mass Action Principle) – postižení je tím větší, čím větší je objem hmoty, která je chirurgicky odstraněna
- Jinými slovy Lashley zastával názor, že paměťová stopa není v mozku lokalizována na jednom místě, ale že je distribuována ve více strukturách, a že příliš nezáleží na tom, kde je léze provedena, ale spíš, jak je toto **poškození rozsáhlé**

Význam Lashleyho myšlenek

- **Oba** zmíněné Lashleyho principy vyvolávaly kontroverze již po svém uvedení.
- Měly však svůj nezastupitelný význam pro další myšlenkový rozvoj koncepce distribuovaného kódování paměti, mnohočetných paměťových systémů (*multiple memories theory*).
- Dnes víme, že v mnoha případech paměťových funkcí distribuce paměťových stop skutečně existuje, avšak na povaze konkrétních mozkových struktur přece jenom záleží.
- Zajímavost: Lashley např. provedl lézi primární vizuální kůry (oblast V1) a následná neschopnost potkanů řešit úlohu *brightness discrimination* (rozlišování jasů) jej vedla k chybnému závěru, že tato korová oblast zodpovídá za tento typ učení

Richard F. Thompson a studium mrkacího reflexu u králíka

- Později badatel **Richard F. Thompson** studoval **klasické podmiňování mrkacího reflexu** u králíka (eye-blink conditioning) a prováděl léze cerebella a jiných oblastí, a dospěl k závěru, že mozeček může být sídlem tohoto engramu.
- Thompson také studovat jádro **nc. interpositus lateralis** (LIP; hluboké jádro mozečku) a zjistil, že pokud je chemicky inaktivováno, dochází k deficitu v tomto typu podmiňování, ukázal tedy, že LIP je také zapojeno v paměťové stopě tohoto typu chování
- Zde je důležité zdůraznit, že ačkoliv Thompsonovy závěry byly v podstatě správné, je podmiňování mrkacího reflexu je velmi neodvozený typ, asociativního, avšak nedeklarativního typu paměti, který se vyskytuje i u velmi jednoduchých živočichů (vzpomeňte na podmiňování zatahovacího reflexu u Aplysie).



Paměťové stopy v případě deklarativní paměti

- Tvorba deklarativní paměti zahrnuje komplexní interakci mezi limbickými strukturami (především hipokampem, amygdalou, entorhinální kůrou, subikulem, septálními jádry) a neokortikálními oblastmi.
- Paměťové stopy jsou zde rovněž distribuovány, ačkoliv mohou být např. během učení v určitých případech distribuovány převážně v hipokampu, viz experiment Mosera a Moserové, kdy částečná hipokampální léze poškodila vybavení v úloze MWM (pokud byla úloha naučena s intaktním celým hipokampem, po částečné lézi nebylo funkční vybavení), avšak zvířete s malou částí hipokampu byla stále schopná se učit.

Mnohočetnost paměťových fenoménů

- Existuje řada **paměťových systémů** (typů paměti) a **paměťových procesů** (mechanismů tvorby paměti)

Základní molekulární mechanismy změn synaptické plasticity, které jsou podkladem učení a paměti, **jsou víceméně univerzální**

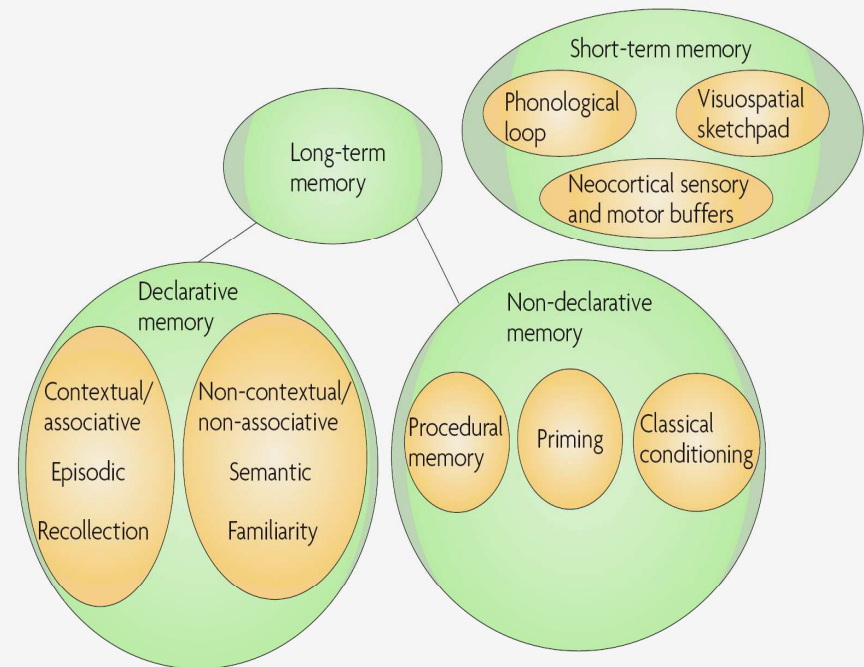


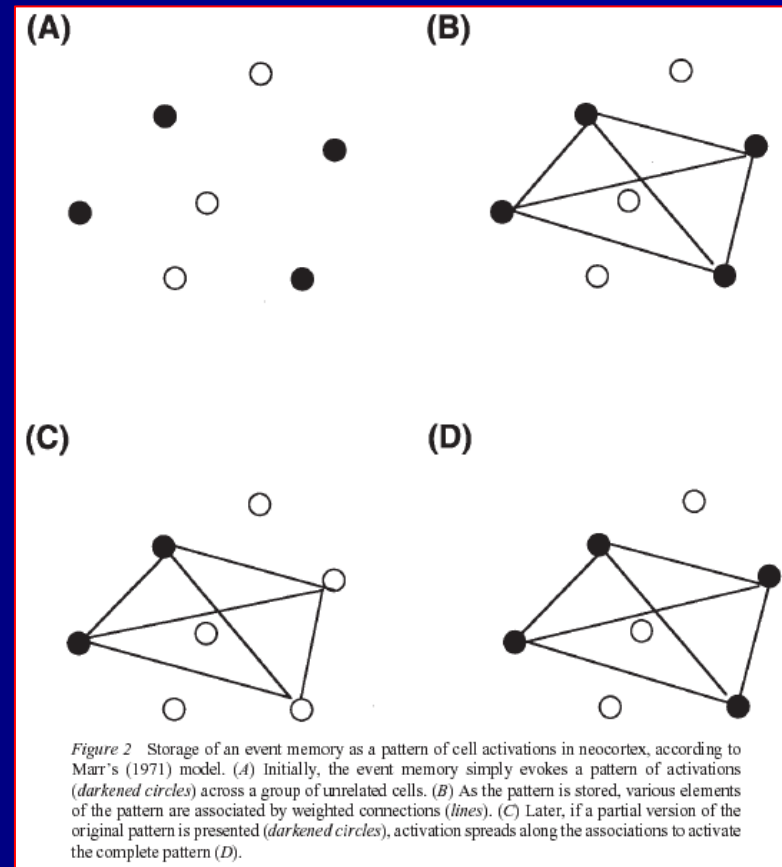
Figure 2 | **The traditional taxonomy of memory systems.** Inspired in part by experimental data from studies of medial temporal lobe amnesia, many researchers have divided long-term memory into a number of separate systems (for example, see REF. 7). Investigating the neural substrates of these systems and whether and how they interact, and gaining a mechanistic understanding of the processing that is associated with each, presents an exciting challenge for memory research.

Marrův model formace archikortikálních stop (1971)

David Courtnay Marr (1945-1980) – britský neurobiolog a psycholog, zabýval se především viděním

V r. 1971 navrhnul autoasociativní model archikortikální (hipokampální) reprezentace paměti, kdy aktivované neurony vytvářely vzájemná spojení na základě zvýšení synaptické účinnosti a následně po vytvoření sítě stačila aktivace části buněk k obnově funkce celé sítě

Model založen na modifikaci synaptických spojení pomocí zkušenosti, umožňoval vybavení paměťové stopy i na základě částečné informace, model se stal východiskem pro mnoho hypotéz o funkci hipokampu, z nichž některé byly potvrzeny.

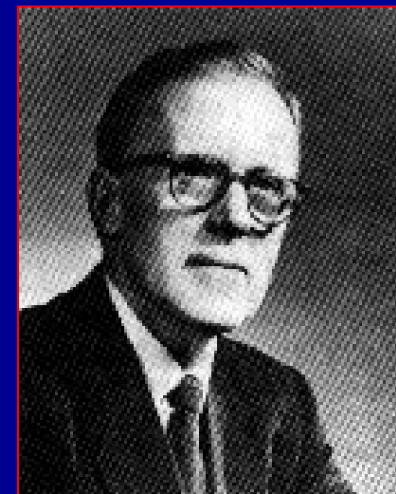


"Simple memory: a theory for archicortex." Phil. Trans. Royal Soc. London, 262:23-81 (1971)

Změnu v účinnosti v synaptickém přenosu jako základ paměťových stop

Hebbův zákon: „When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly and persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficacy, as one of the cells firing B, is increased.“

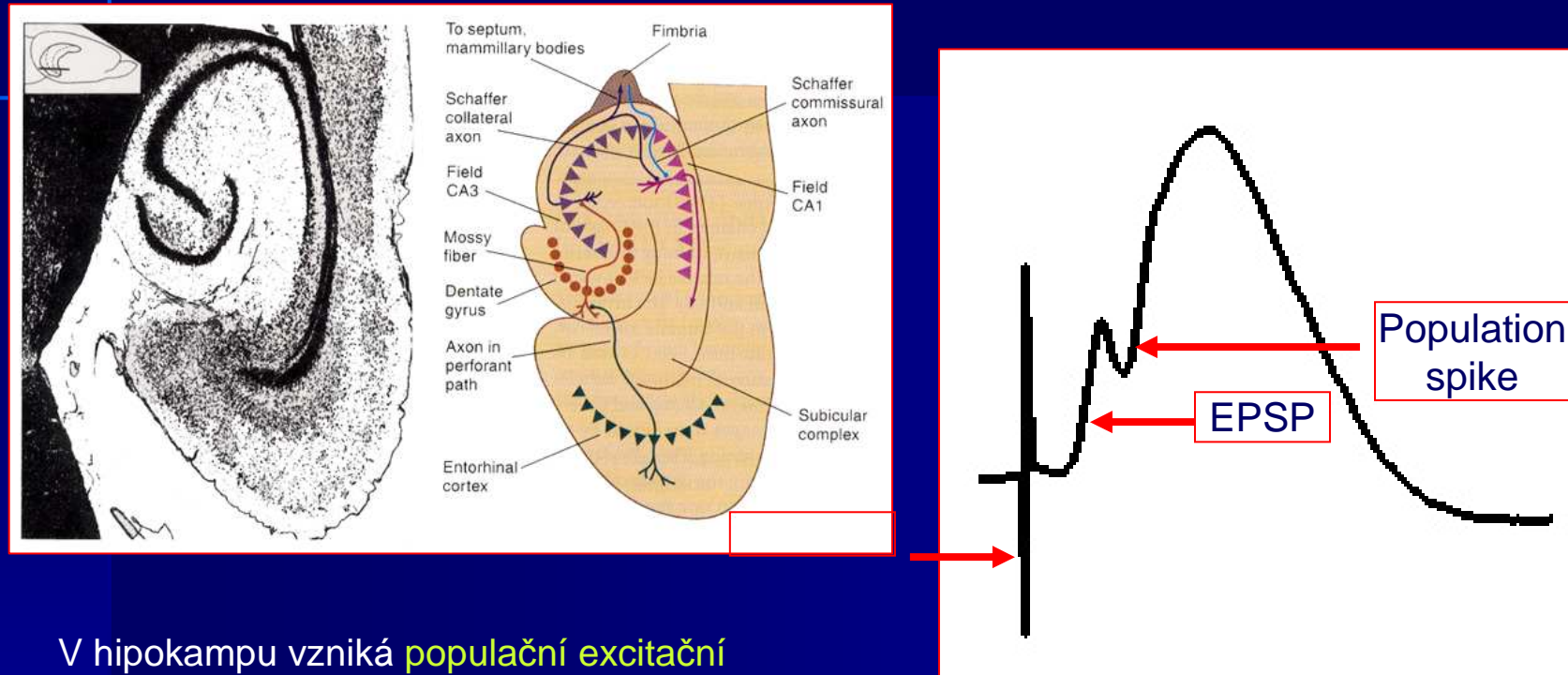
“Cells that fire together wire together”



Donald Hebb

Typu synaptické plasticity: **LTP**, **LTD**, ale existují i krátkodobé změny v účinnosti, jako např. synaptická facilitace, augmentace, post-tetanická potenciace (pozorovány i na nervosvalovém spojení) – trvají od desítek až stovek ms do řádu desítek minut, z častého je za jejich indukci zodpovědné přetrvávající presynaptické zvýšení koncentrace vápníku

Evokované potenciály v hipokampu



V hipokampu vzniká **populační excitační postsynaptický potenciál** v odezvě na dráždění aferentních vláken

Populační excitační postsynaptický potenciál (fEPSP) v gyrus dentatus drážděním perforující dráhy (svazku přicházejícího z entorhinální kůry)

EPSP (intracelulárně – u větších vláken, popř. pomocí techniky terčíkového zámku
fEPSP (field-EPSP) – extracelulárně, připadá v úvahu u struktur s pravidelným uspořádáním neuronů do vrstev a lamin – viz hipokampus

Dlouhodobá potenciace v hipokampu jako kandidát na neuronální substrát paměťové stopy

LTP popsána poprvé v r. 1973 v hipokampu anestetikovaného králíka – dlouhodobé zvýšení EPSP po tetanickém dráždění

Později popsána i u volně pohyblivých zvířat, včetně potkanů a myší

Obecně se LTP dělí na časnou (E-LTP) a pozdní fázi (L-LTP).

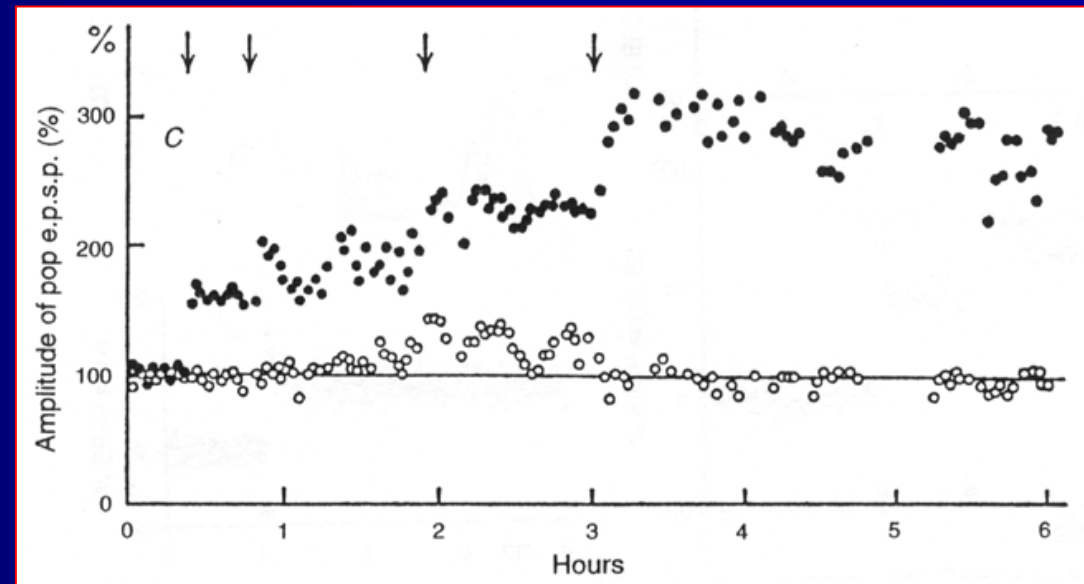
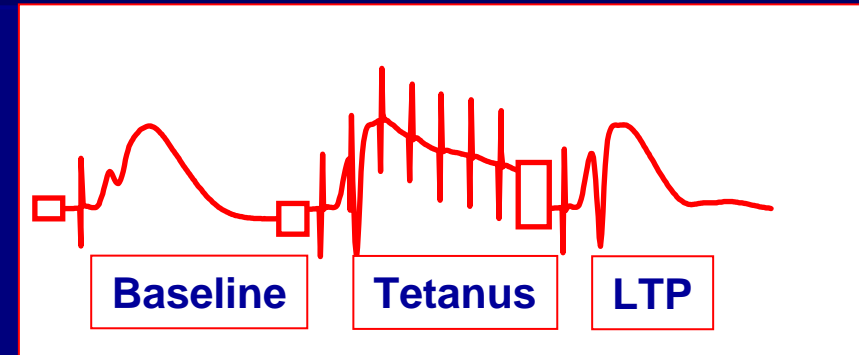
E-LTP nezávisí na proteosyntéze, pozdní vyžaduje tvorbu nových bílkovin.

Lákavé přirovnání

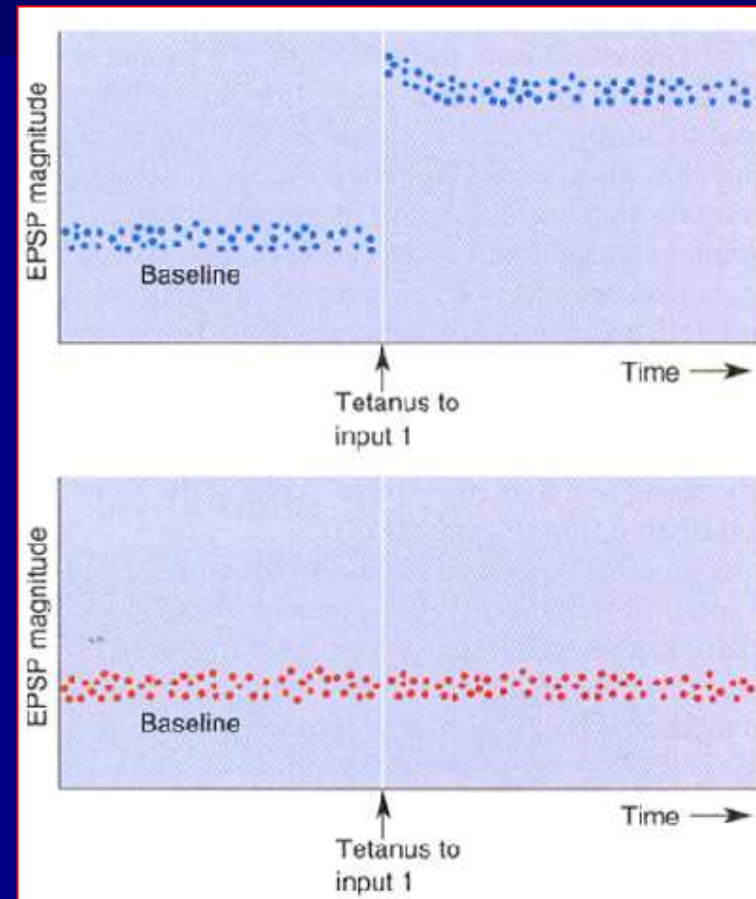
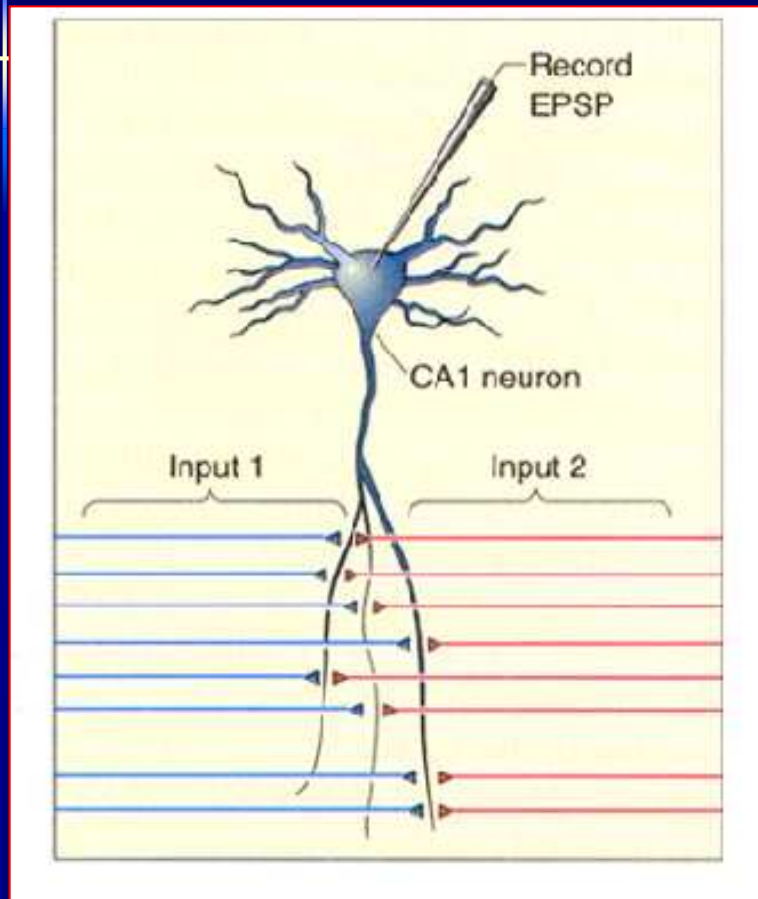
E-LTP ~ krátkodobá paměť

L-LTP ~ dlouhodobá paměť

Není to tak jednoznačné

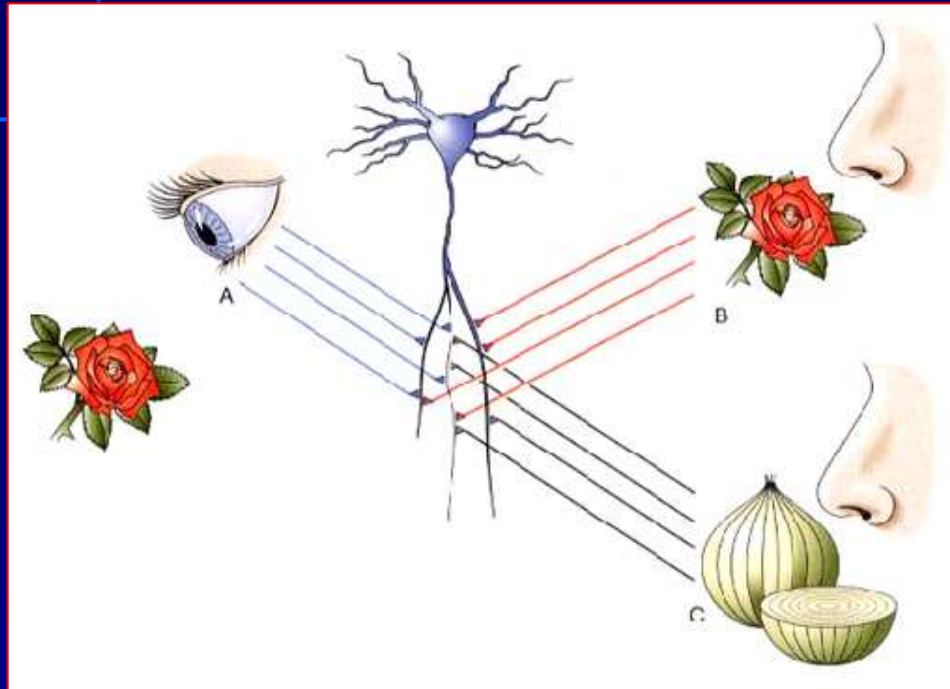


LTP vykazuje specificitu

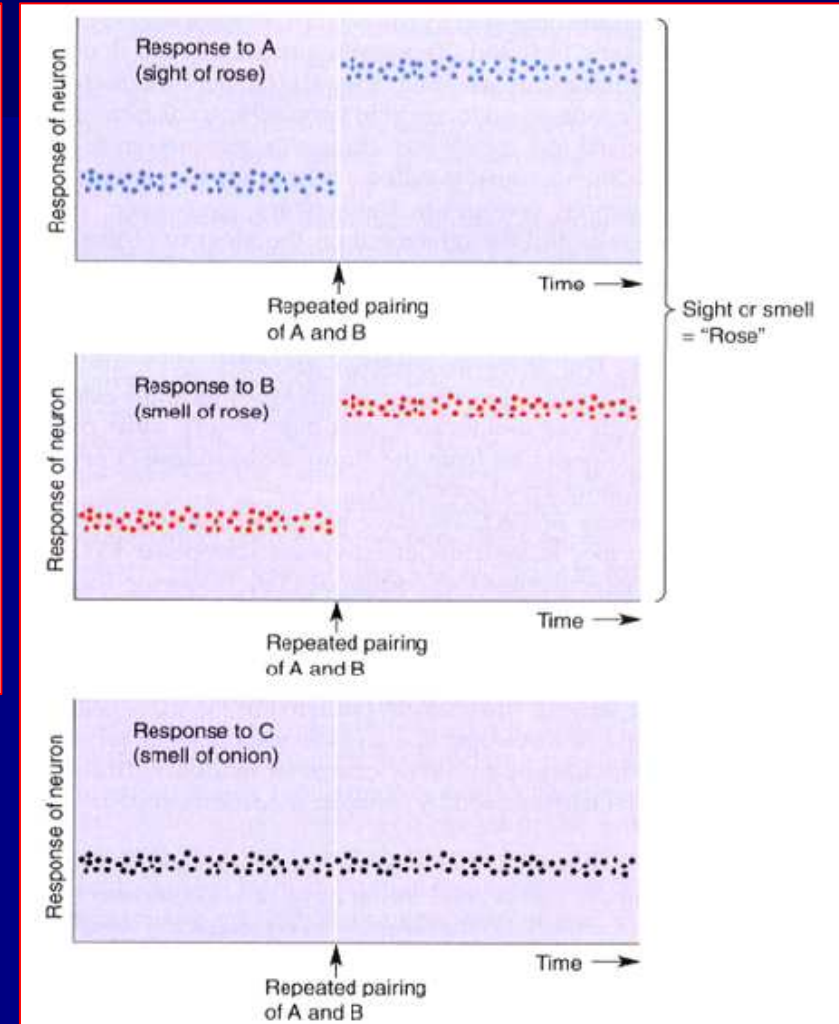


- Během dráždění určitého vstupu **dochází k potenciaci pouze u tohoto stimulovaného vstupu, a ne u sousedních vstupů** (pakliže nejsou tyto vstupy funkčně spřaženy, popř. stimulovány současně – viz asociativita a kooperativita)

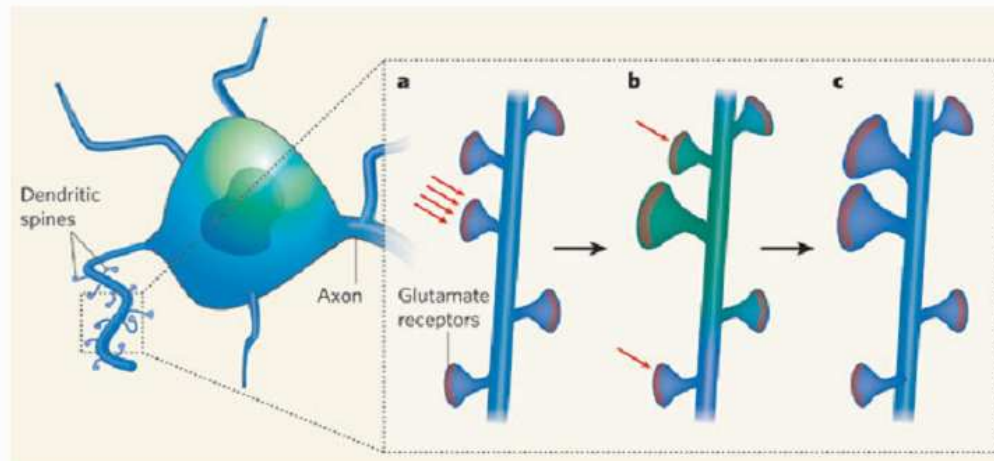
LTP vykazuje asociativitu



- **Asociativita** představuje fenomén, kdy relativně slabá stimulace na jednom vstupu není dostatečná aby vyvolala LTP, současné silná stimulace na jiném, funkčně asociovaném vstupu vyvolá LTP na obou vstupech.
- Často je pozorována např. na synapsích Schafferových kolaterál z hipokampální oblasti **CA3 do CA1**



LTP vykazuje kooperativitu



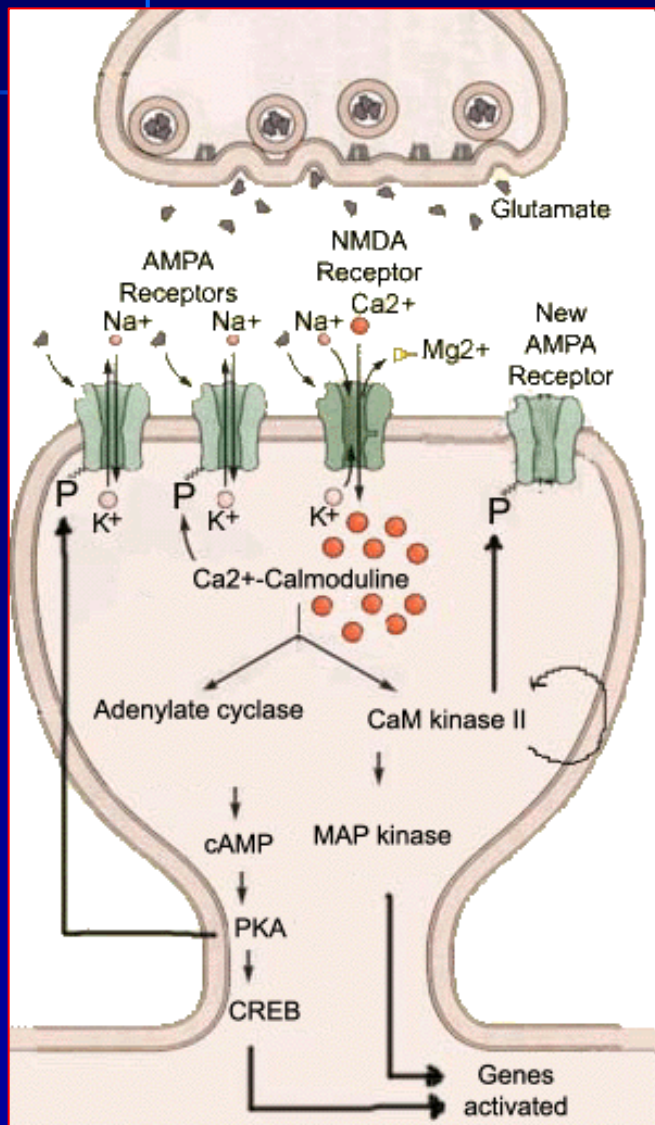
Five dendritic spines, each containing the same number of postsynaptic glutamate receptors, are shown. **a**, When a strong stimulus (red arrows) induces long-term potentiation (LTP) at a single spine, it causes the stimulated spine to grow (**b**).

Harvey and Svoboda³ find that LTP induction at one spine also lowers the threshold for LTP induction at its immediate neighbours (within a distance of 10 micrometres). Consequently, weak stimulation of a nearby spine (red arrow) is sufficient to induce LTP and functional and structural plasticity in the neighbouring synapses (**c**). Weak stimulation of the lower spine that lies outside this zone, however, does not induce plasticity. Approximately 10 minutes after the original stimulation, the plasticity threshold returns to normal and spine growth is stabilized.

LTP může být indukována buď **silným tetanickým drážděním jednoho vstupu**, nebo **kooperativně slabším drážděním více vstupů současně**. Pokud je stimulován slabě jen jeden vstup, nedosáhne depolarizace hodnoty potřebné k indukci LTP. Pokud je však takovouto slabší stimulací drážděno **více konvergujících vstupů**, může dojít k sumaci těchto efektů a následné tvorbě dlouhodobé potenciace.

Někteří autoři zastávají názor, že rozdíl mezi kooperativitou a asociativitou je pouze sémantický

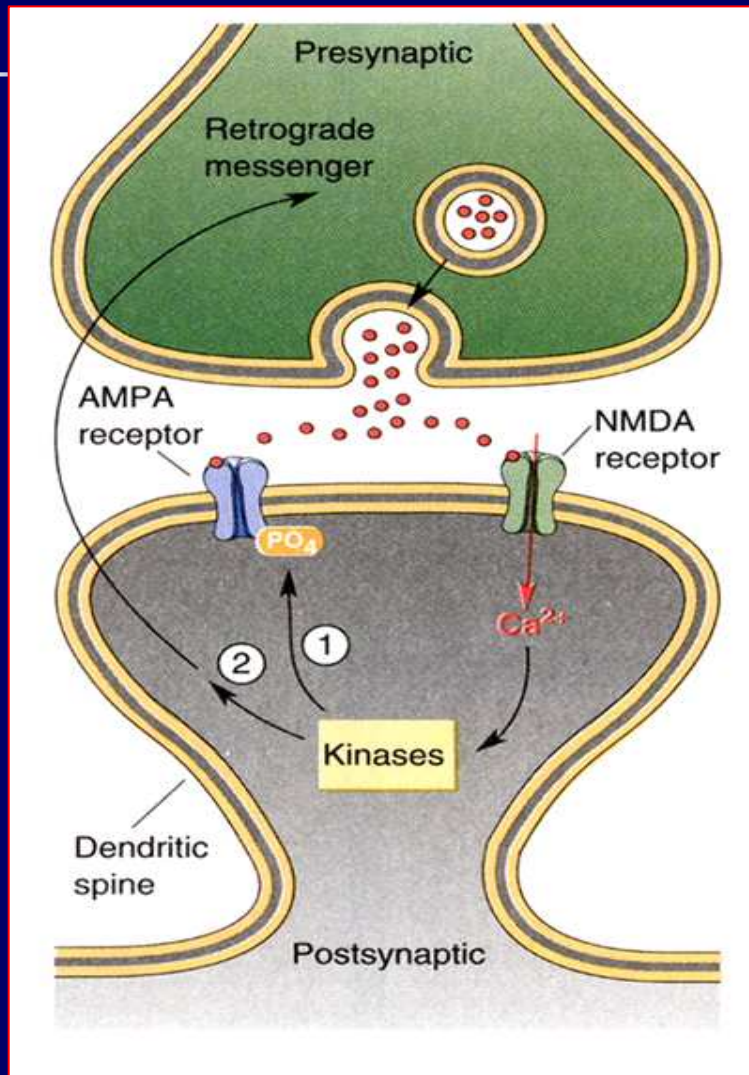
Mechanismy podmiňující indukci časné LTP



Aktivace AMPA receptorů – deplarizace odblokuje hořík z ústí NMDA receptorů

- **Po aktivaci NMDA receptorů vtok Ca²⁺ do buňky** – Ca²⁺ se váže na kalmodulin – komplex vápník/kalmodulin aktivuje CaMKII (kalcium/kalmodulin-závislá kináza II)
- Paralelní aktivace adenylylcyklázy – tvorba cAMP – aktivace PKA
- **CaMKII - fosforylace AMPA receptorů a inserce nových AMPA receptorů** do postsynaptické membrány
- **CaMKII** posléze podstupuje autofosforylaci a stává se konstitutivně aktivní (i po návratu Ca²⁺ na normální hladinu) - přechod k udržovací fázi časné LTP

Exprese pozdní LTP – udržovací fáze



Mnoho signálních kaskád (CaMKII, PKC) může konvergovat aktivací *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Ta je patrně spojovacím článkem mezi časnou a pozdní LTP.

ERK fosforyluje řadu proteinů a signálních molekul (jak cytoplazmatických, tak jaderných), včetně transkripčních faktorů.

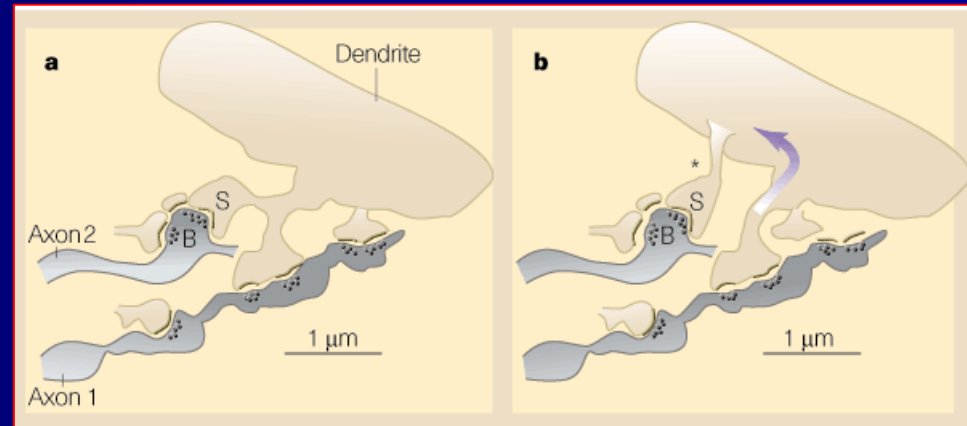
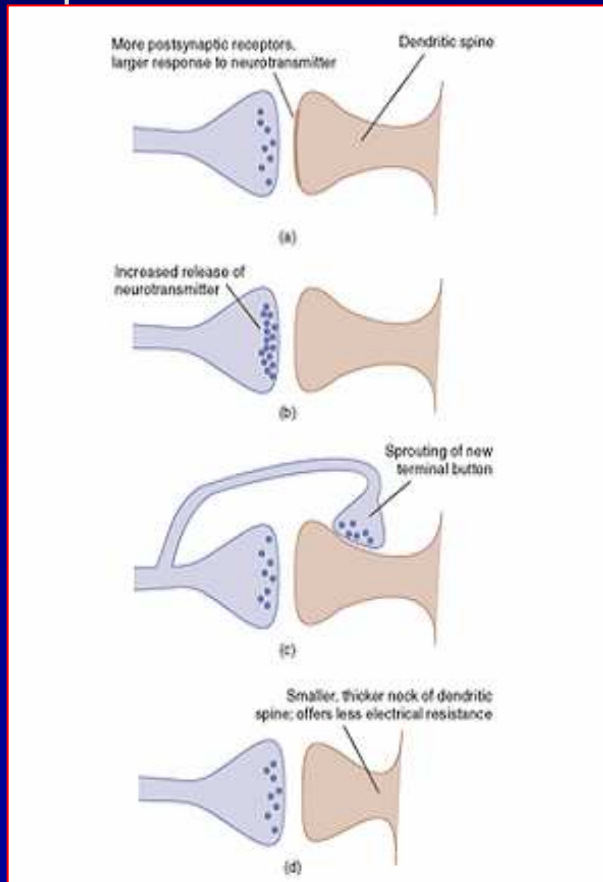
Klíčovou molekulou pro udržovací fázi pozdní LTP je proteinkináza Mzeta (PKM ζ)

Je to atypická izoforma PKC, která postrádá regulační podjednotku a je trvale aktivní.

Tato molekula je syntetizována a je nezbytnou a dostačující podmínkou pro L-LTP

Zároveň je tato molekula substrátem dlouhodobé paměti – viz později

V rámci LTP existuje více možností zasílení synaptické účinnosti



Inzerce nových receptorů do postsynaptické membrány
– větší odpovědí na stejné množství neuropřenašeče

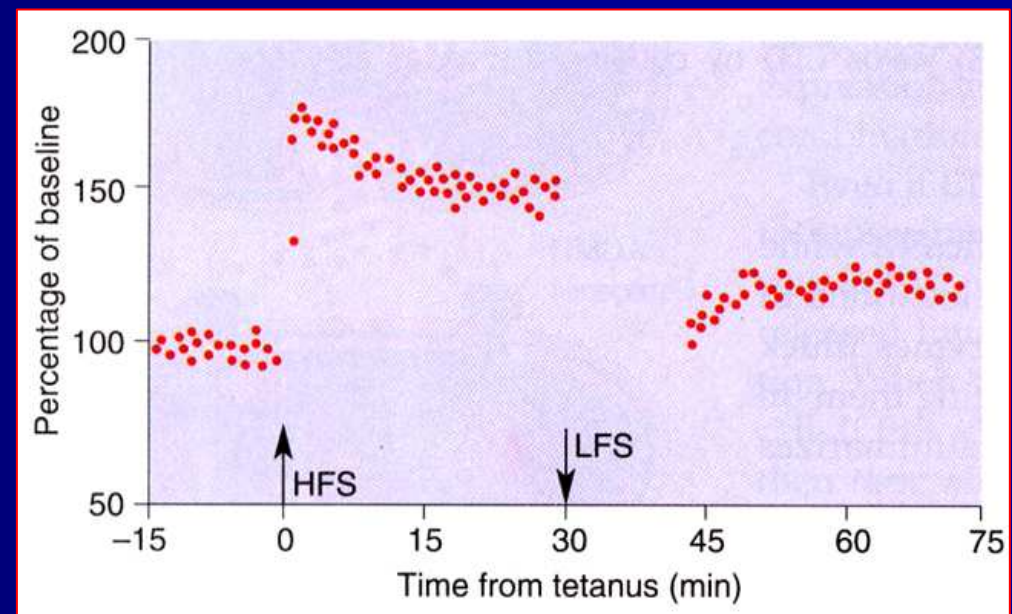
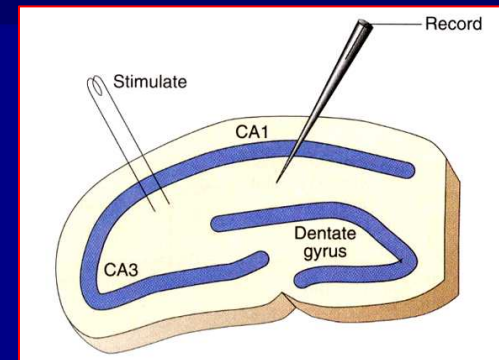
Zvýšení výlevu prostřednictvím retrográdního signálu –
nejasné, uvažuje se o NO, popř. extracelulárních
adhezních molekulách

Rašení nových synaptických knoflíků

Ztenčení krčku dendritického trnu – změna elektrických
vlastností – vyšší excitabilita

Dlouhodobá deprese - LTD

- Opak dlouhodobé potenciace, jde o **dlouhodobé snížení účinnosti synaptického přenosu následkem repetitivní stimulace presynaptických vstupů**
- **Je to vlastně protějšek LTP**, z fyziologického hlediska se zdá být intuitivně nezbytný („what goes up, must go down“)
- Vyskytuje se např. v **hipokampu** (nízkofrekvenční stimulace) nebo v **Purkyňových buňkách mozečku** (silná stimulace)



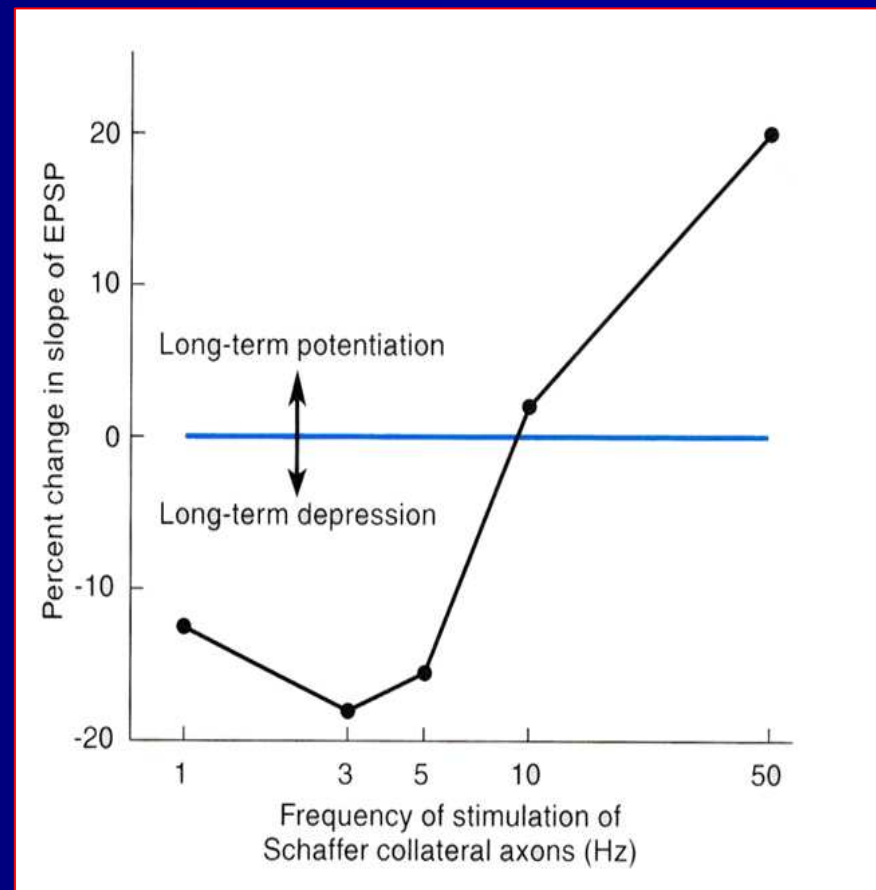
Dlouhodobá deprese - LTD

Na synapsích Schafferových kolaterál (spojení hipokampálních oblastí CA3 a CA1) lze vyvolat LTP i LTD tetanickým drážděním, klíčovým faktorem pro to, který fenomén bude indukován, je frekvence dráždění (viz obrázek).

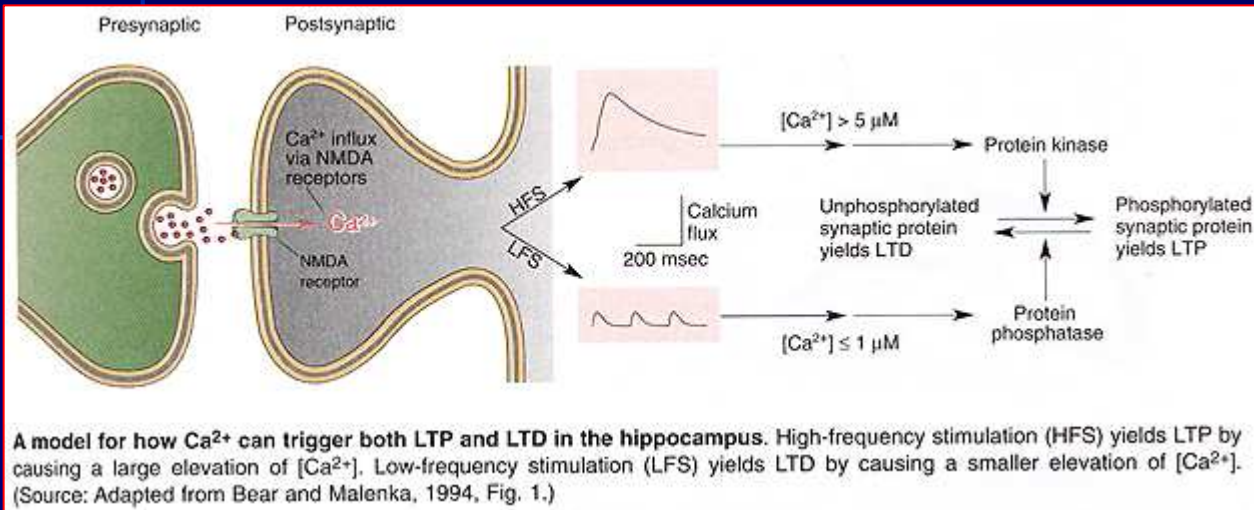
Nízkofrekvenční stimulace vede ke vzniku LTD.

LTD je odlišná od tzv. synaptické depotenciace, což je de facto návrat LTP na klidovou hladinu.

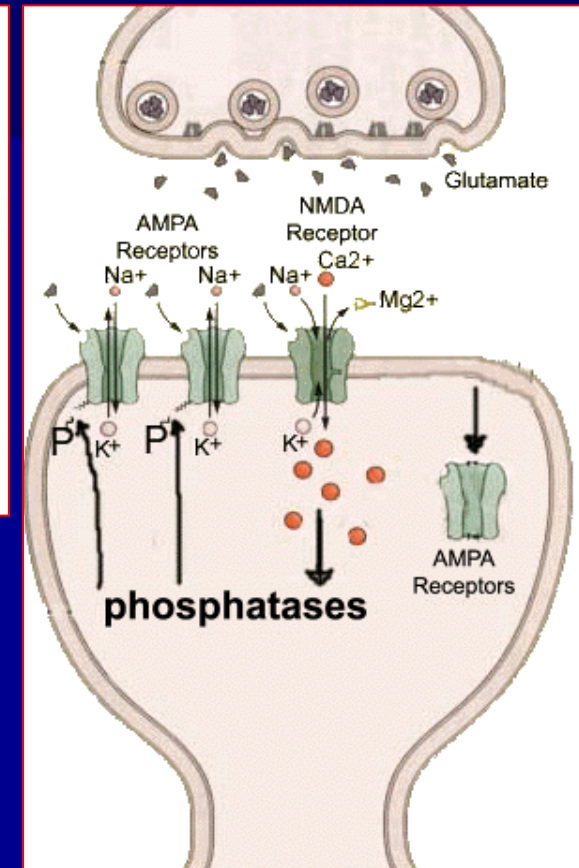
V mozečku se LTD účastní motorického učení.



Dlouhodobá deprese - LTD



A model for how Ca^{2+} can trigger both LTP and LTD in the hippocampus. High-frequency stimulation (HFS) yields LTP by causing a large elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$. Low-frequency stimulation (LFS) yields LTD by causing a smaller elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$. (Source: Adapted from Bear and Malenka, 1994, Fig. 1.)



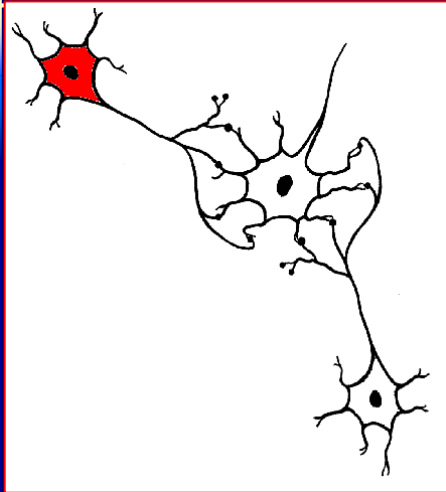
LTD je podmíněna zpravidla aktivací NMDA receptorů (ne vždy), ale o nižší hodnotě, a zvýšením intracelulárního vápníku, avšak na nižší hladinu, než jaká je pozorována u LTP.

Někdy se LTD mohou účastnit také metabotropní glutamátové receptory (mGluR), popř snad i kanabinoidní receptory (také spřažené s G-proteinem)

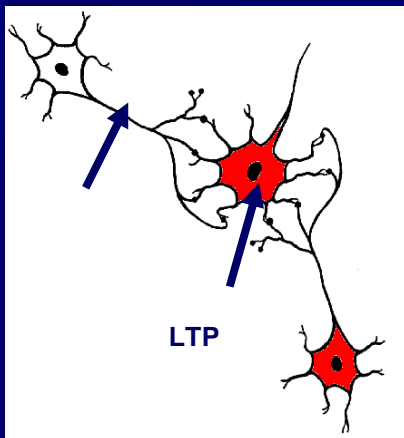
Indukce LTD zahrnuje aktivaci fosfatáz (defosforylující enzymy), které následně sníží citlivost glutamátových receptorů a tím redukuje postsynaptickou odpověď na neuropřenašeč.

Může zahrnovat také internalizaci AMPA receptorů z postsynaptické membrány do intracelulárních kompartmentů.

Homosynaptická a heterosynaptická LTD



Homosynaptická LTD



- **Homosynaptická LTD** – vzniká předchozím drážděním **stejně dráhy, kde je poté sledována amplituda EPSP**
- **Heterosynaptická LTD** – vzniká tetanickým drážděním odlišného vstupu do neuronu než kde je poté měřena synaptická odpověď - pozorována poprvé jako **korelát LTP v hipokampu, indukci LTP na jednom vstupu do neuronu došlo k LTD na jiných sousedících synapsích do tohoto neuronu**

Studium vztahu LTP a učení/paměti

**Je LTP (popř. LTD – méně studovaná)
skutečně podkladem učení a paměti ?**

Teoretická koncepce studia vztahu “LTP-paměť”

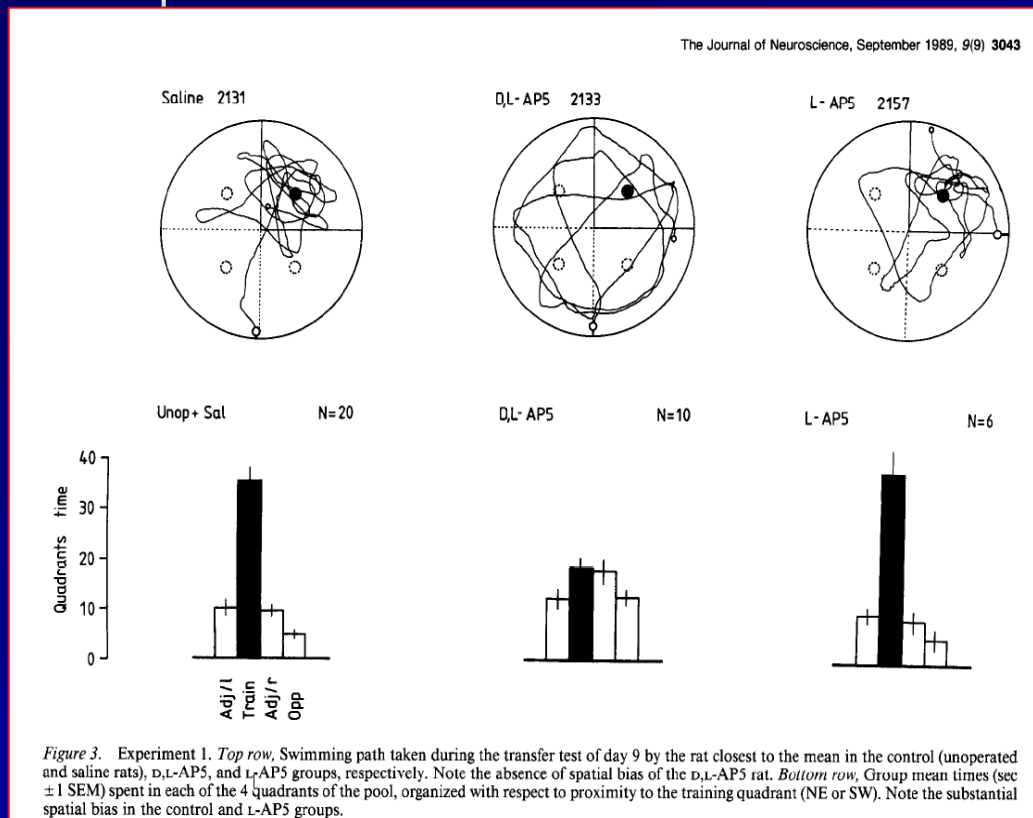
Zkušenost → Změna synaptické účinnosti
(přirozená plasticita) → Paměť

Tetanizace → Změna účinnosti
synaptického přenosu
(LTP) → Zvýšení evokované
odpovědi (EPSP)

Typy studií zabývajících se vztahem LTP - paměť:

- Vliv učení na synaptickou sílu a LTP
- Vliv tetanizace (saturace LTP) na učení
- Vliv manipulace (např. blokády) synaptické plasticity na učení paměť

Manipulace (blokáda) LTP ovlivňuje učení



Studie R. Morrise ukázala, že po aplikaci antagonisty NMDA receptorů, látky D,L-AP5, došlo jak k zablokování indukce LTP tak neschopnosti učení ve vodním bludišti

Vidíte, že potkani, jimž byl aplikován D,L-AP5 hledali během *probe trialu* ostrůvek víceméně náhodně, na rozdíl od situace po aplikaci L-AP5 – neaktivní izomer.

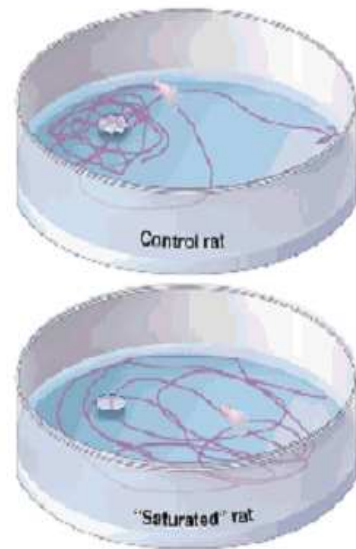
Blokáda indukce LTP, přestože blokuje učení, však automaticky neimplikuje, že LTP je substrátem učení, je možné, že pouze dochází k zablokování nějakých společných mechanismů.

Saturace LTP poškozuje učení

Původní studie Mosera et al. ukázala, že pokud byli potkani tetanizováni na většině synapsí v hipokampu, tzn. došlo k saturaci LTP, poškodilo to učení a paměť.

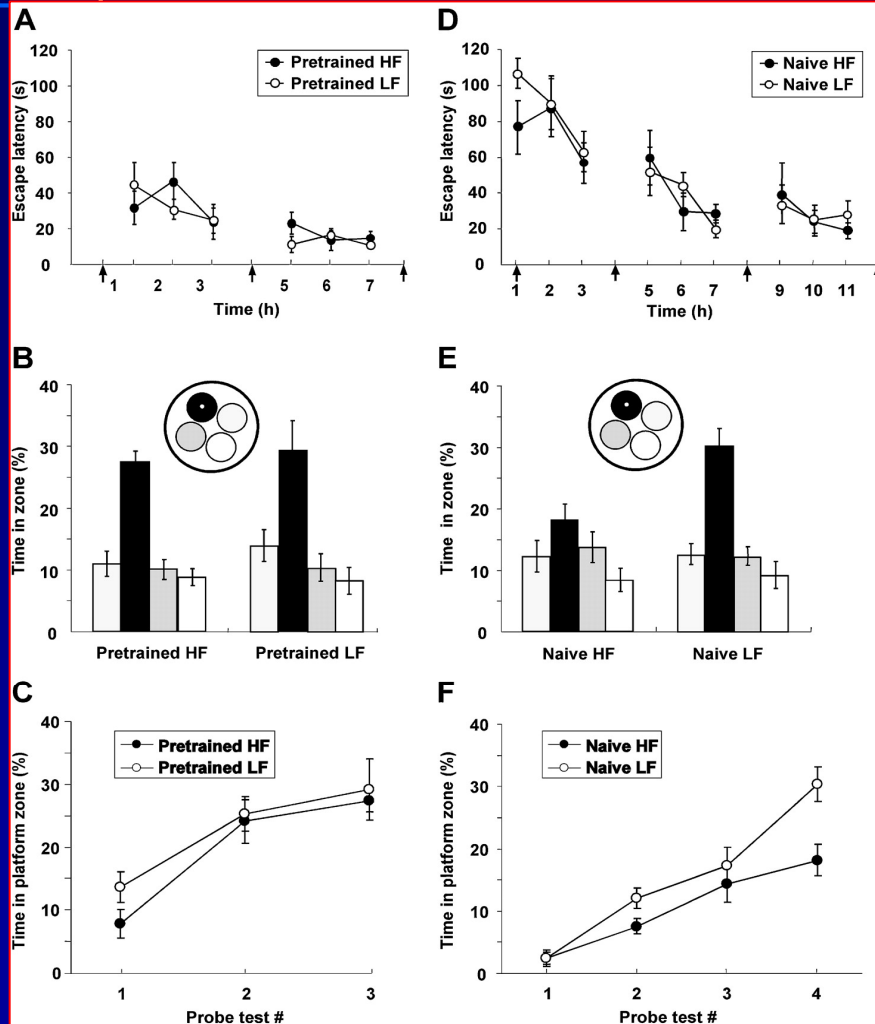
To naznačuje vztah mezi LTP a učním.

Je tu však velké ALE. Tito potkani nebyli před saturací LTP obeznámeni s pravidly úlohy.



Swim paths of rats in a water maze. Well-trained control rats swim mostly over the region of the pool where the submerged platform (square at left) was located during training. "Saturated" rats, in which LTP in the dentate gyrus is saturated before training, swim randomly, showing no memory of the platform's location. Rats in which the saturation procedure failed behave like control rats.

Intaktní předtrénování pravidlům úlohy odstraní negativní vliv saturace LTP na učení



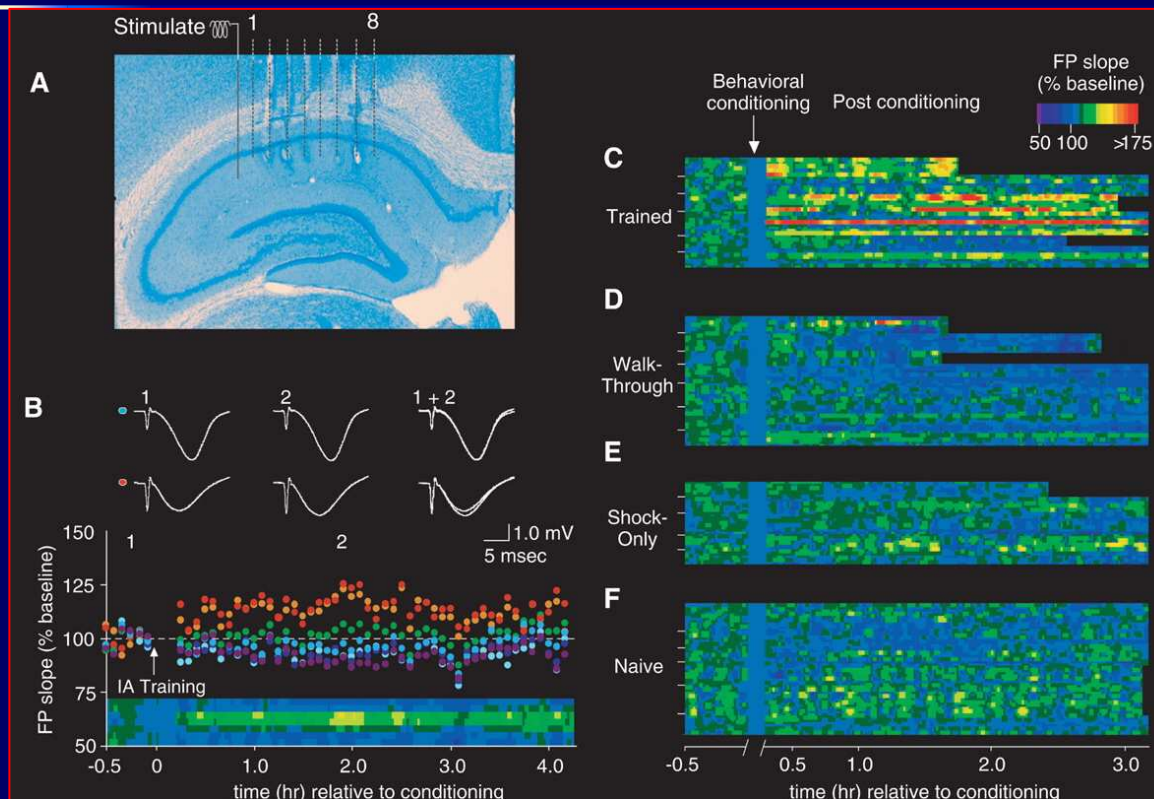
- Pokud zvířata podstoupí před saturací LTP tzv. NSP (*non-spatial pretraining*; neprostorové předtrénování), deficit vzniklý saturací LTP již není pozorován.

- Indukce LTP tedy v tomto případě spíše zodpovídá za procedurální aspekt úlohy – to je právě ten, který si zvířata osvojí během NSP

- NSP zpravidla realizováno tréninkem potkanů v bazénu bez orientačních bodů (záclona), přičemž poloha ostrůvku se náhodně mění.

- Zvířata se tedy naučí pravidla úlohy, tzn. že je třeba hledat ostrůvek, že thigmotaxe nikam nevede, pouze se nenaučí, KDE ostrůvek je.

Dochází při učení skutečně k indukci LTP ?



Whitlock a jeho kolegové trénovali potkany v úloze pasivního vyhýbání (inhibitory avoidance) a zjistili, že u některých synapsí dochází vlivem učení k indukci LTP

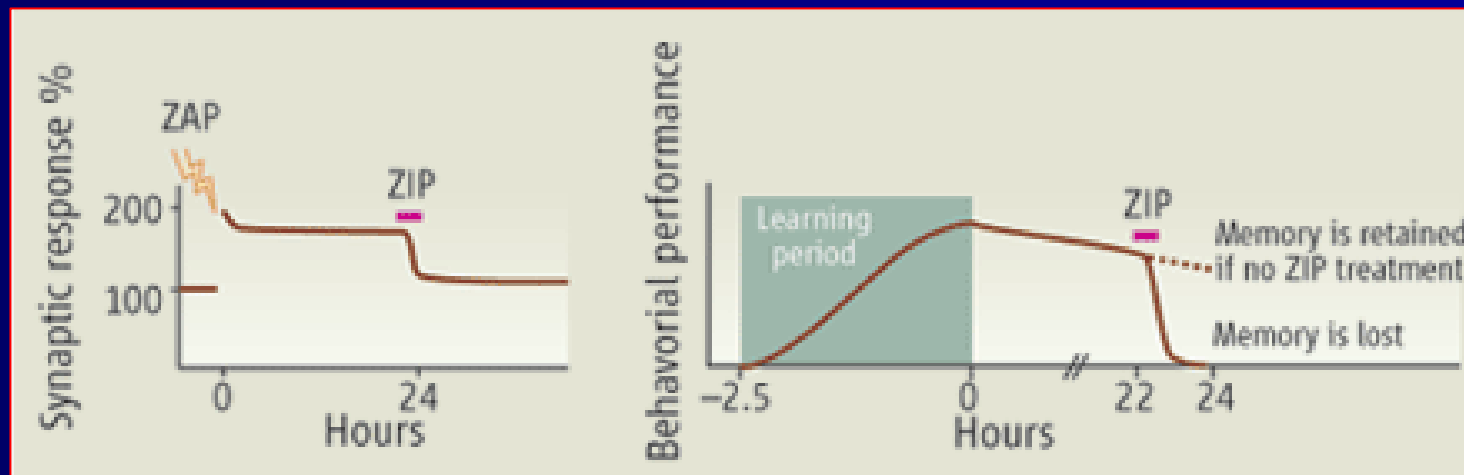
U mnoha z měřených neuronů však LTP indukována není.

Je to rovněž podpůrným důkazem pro „distributed memory encoding“

- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. Science. 2006; 313(5790):1093-7

Inhibice PKM ζ vede k vymizení LTP a k vymazání již ustavené dlouhodobé paměťové stopy

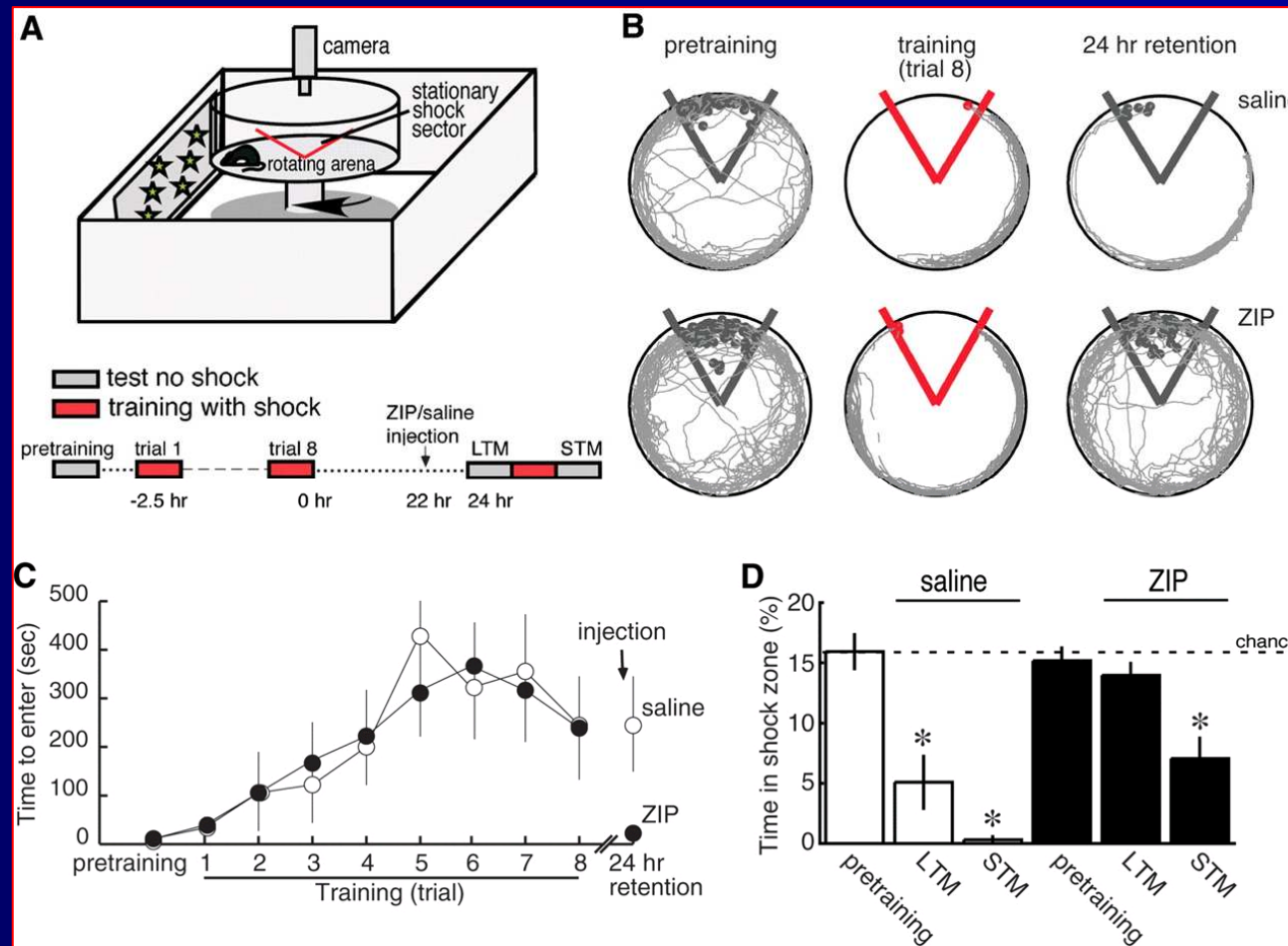
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. Science. 2006;313(5790):1141-4



Specifický blokátor PKM ζ byl aplikován do hipokampu a zablokoval jak pozdní LTP, tak vybavení naučené informace avšak neovlivní nové učení, **tzn. že PKM ζ nehraje patrně roli v indukci časně LTP**

Prokázáno bylo, že syntéza PKM ζ je nezbytnou a dostačující podmínkou pro udržovací fázi pozdní LTP

Inhibice proteinkinázy Mzeta



Otázky do budoucna

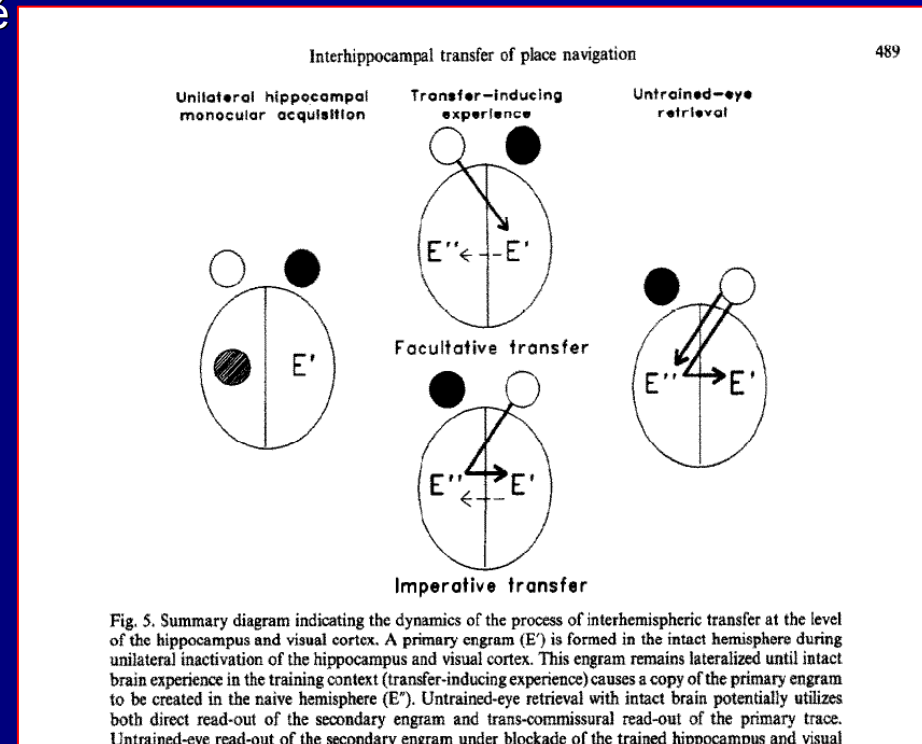
- Je LTP indukována také jinými typy učení než pasivním vyhýbáním?
- Maže inhibice PKM ζ pomocí peptidu ZIP také jiné druhy paměti než place avoidance, což je kognitivní úloha vysoce závislá na hipokampu?
- Je toto vymazání paměti patrné i v jiných strukturách v mozku než je hipokampus?
 - Některé určitě, např. chuťovou averzi v inzulárním kortexu, viz: Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. Science; 317(5840):951-3
 - Velmi nedávno bylo prokázáno, že u řady typů paměti tento mechanismus funguje, konkrétně pro prostorovou, operantní paměť a klasické podmiňování u savců
 - Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JC, Sacktor TC, Fenton AA. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. PLoS Biol. 2008 Dec 23;6(12):2698-706.

Lateralizace paměťové stopy

- **Lateralizace** má obecně více významů – jednak rozdíly mezi jednotlivými polovinami jednotlivých bilaterálních mozkových struktur (např. mírně rozdílný objem pravého a levého hipokampu, měřený volumetricky (např. u lidí i u potkanů – zajímavostí je, že albinotičtí potkani Wistar jsou v hipokampu lateralizováni podobně jako člověk, zatímco pigmentovaná zvířata z kmene Long-Evans jsou hipokampálně lateralizována opačně).
- Další význam tohoto pojmu – lateralizace určité funkce (často u lidí) – např pomocí fMRI bylo zjištěno, že při určitých mentálních úlohách se aktivuje jedna strana mozku více než druhá (PFC, hipokampus) – implikuje, že funkce „sídlí“ ve větší míře v jedné z polovin - **lateralita**
- **V experimentální rovině** – např. potkani trénováni naučit se MWM, kterým byl každý den před tréninkem „vypnut“ jeden z hipokampů pomocí TTX (+ zakrytí opačného oka), naučí se také úlohu – říká se, že paměťová stopa byla lateralizována do jednoho hipokampu – tento typ lateralizace je poměrně málo studován – Bureš a Fenton, 90.léta v naší laboratoři
- Tento typ lateralizace lze snadno detekovat pomocí testu vybavení, kdy „vypneme“ natrénovanou hemisféru a zvířeti pak zbývá k navigaci pouze hemisféra neivní – vybavení bylo skutečně poškozeno

Interhemisferální transfer paměťové stopy

- Bureš a Fenton ukázali, že kromě lateralizace může u této stopy docházet také ke spontánnímu či nucenému přesunu paměťové stopy z jedné natrénované hemisféry do druhé.
- Spontánní transfer je vyvolán zpravidla krátkou expozicí prostředí s oběma hemisférami intaktními
- Nucený transfer je vyvolán ponecháním obou hemisfér intaktních a odkrytím obou očí



Interhipokampální syntéza lateralizovaných engramů

- Fenton a spol. ukázali, že je možné každou hemisféru natrénovat na 2 orientační body (použili celkem pouze 4 orientační body, ABCD).
- Levá AB, pravá CD, posléze testovali úspěšnost s oběma hemisférami intaktními
- Výkonnost AB (stejně jako při osvojení) > pouze AC (syntéza – stále vysoko nad hranicí náhody) > AE (s novým, neznámým orientačním bodem; na hranici náhody)
 - *Fenton AA, Arolfo MP, Nerad L, Bures J. Interhippocampal synthesis of lateralized place navigation engrams. Hippocampus, 1995*
- Tento typ experimentů vyžaduje precizní kontrolu orientačních bodů, Fenton a spol tento pokus prováděli v MWM ve tmě, body ABCD byly pouze svítící obrazce.

Patofyziologie paměťových stop

- Amnézie, hypermnézie (Solomon Šereševskij-neuropsycholog A. Lurija)
- Amnézie – retrográdní, anterográdní – nemusí být absolutní, mohou být gradované
- Například pacient H.M. (s resekcí MTL včetně hipokampu) trpí anterográdní amnézií a časově gradovanou retrográdní amnézií – nepamatuje si události těsně před operací, ale velmi staré vzpomínky zachovány.

► A Schematic Definition of Retrograde Amnesia and Anterograde Amnesia

