



PGS Pokroky v neurovědách

Novinky v oblasti výzkumu kognitivních funkcí

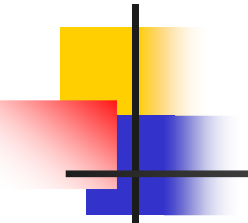
Aleš Stuchlík a Štěpán Kubík



Metody studia učení a paměti

- Behaviorální techniky – viz výše
- Elektrofyzilogie – in vitro
 - In vitro
 - In vivo
 - **Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat**
- Léze, funkční léze, genetické léze
- **IEG Imaging**
- Mikrodialýza
- Funkční zobrazování - fMRI, PET

Hipokampus – Mekka neurovědčů

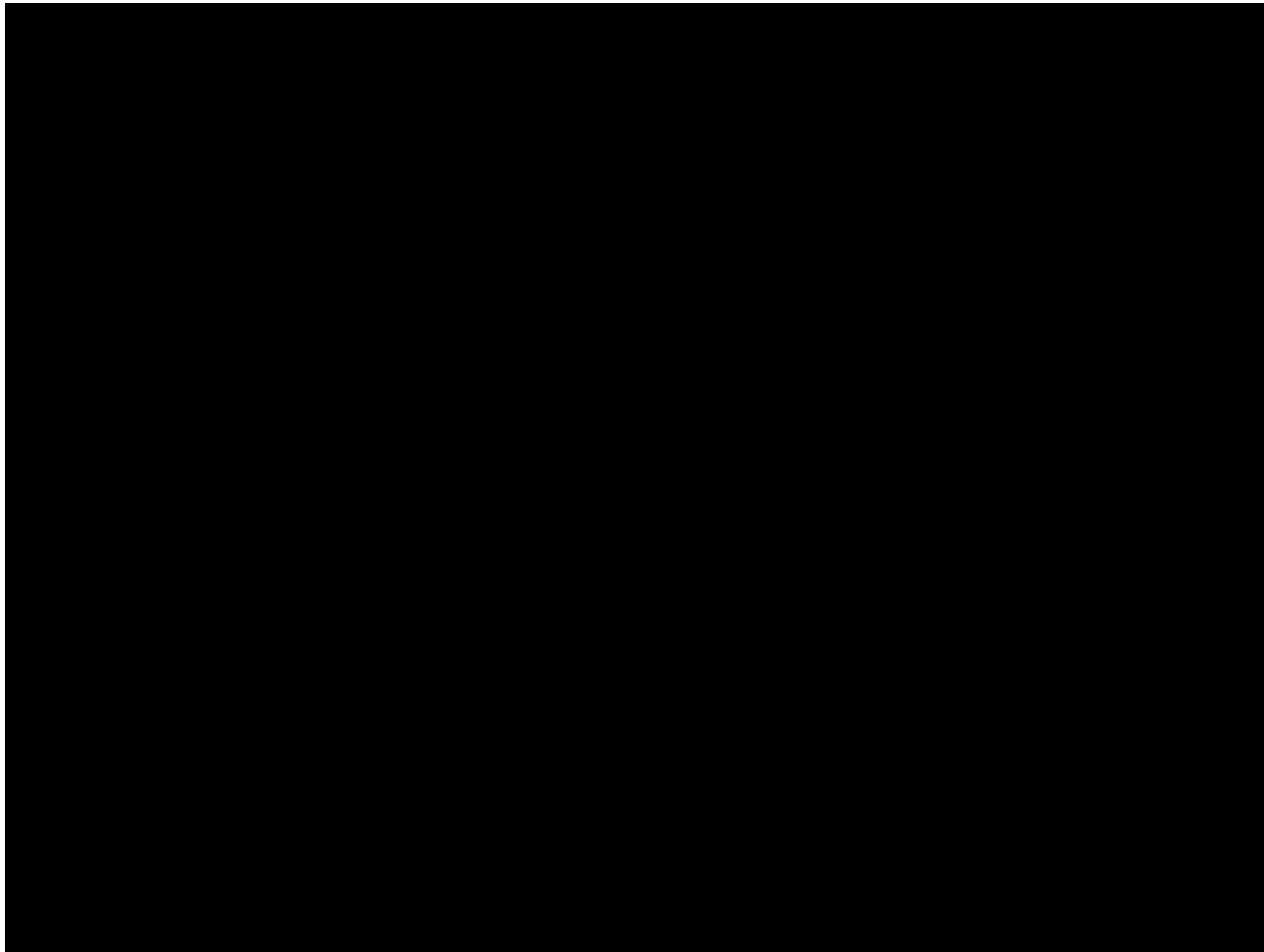
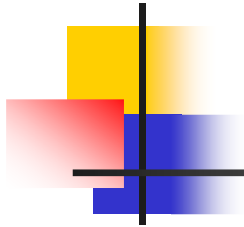
- 
- Anterográdní amnézie po lézi hipokampu u člověka – Scoville a Milner, 1957
 - Synaptická plasticita - LTP – Bliss a Lømo, 1973
 - Prostorová paměť – Barnes, 1979; Morris, 1982
 - Place cells – místní neurony – O'Keefe a Dostrovsky, 1971



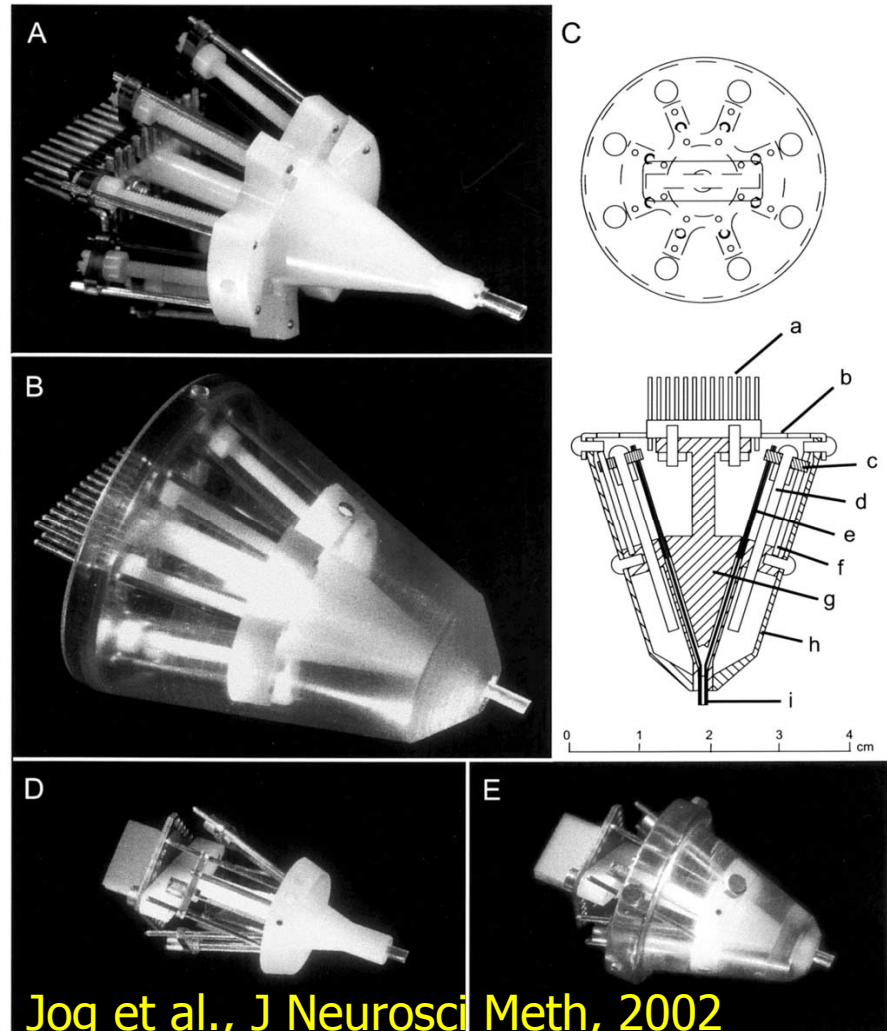
Eletrofyzologie

- Multiple single unit recording
 - Tetrody
 - Klastrování
 - rozřídění multijednotkového záznamu na jednotlivé neurony
 - Firing rate maps
 - zprůměrovaná aktivita
 - Time series
 - – jednotlivé epizody – detailní časová informace
 - Neuronal ensembles
 - Množiny neuronů účastnící se téže reprezentace

Hippocampal place cells



Headstages and rats



Jog et al., J Neurosci Meth, 2002

Tetrodes & microdrives

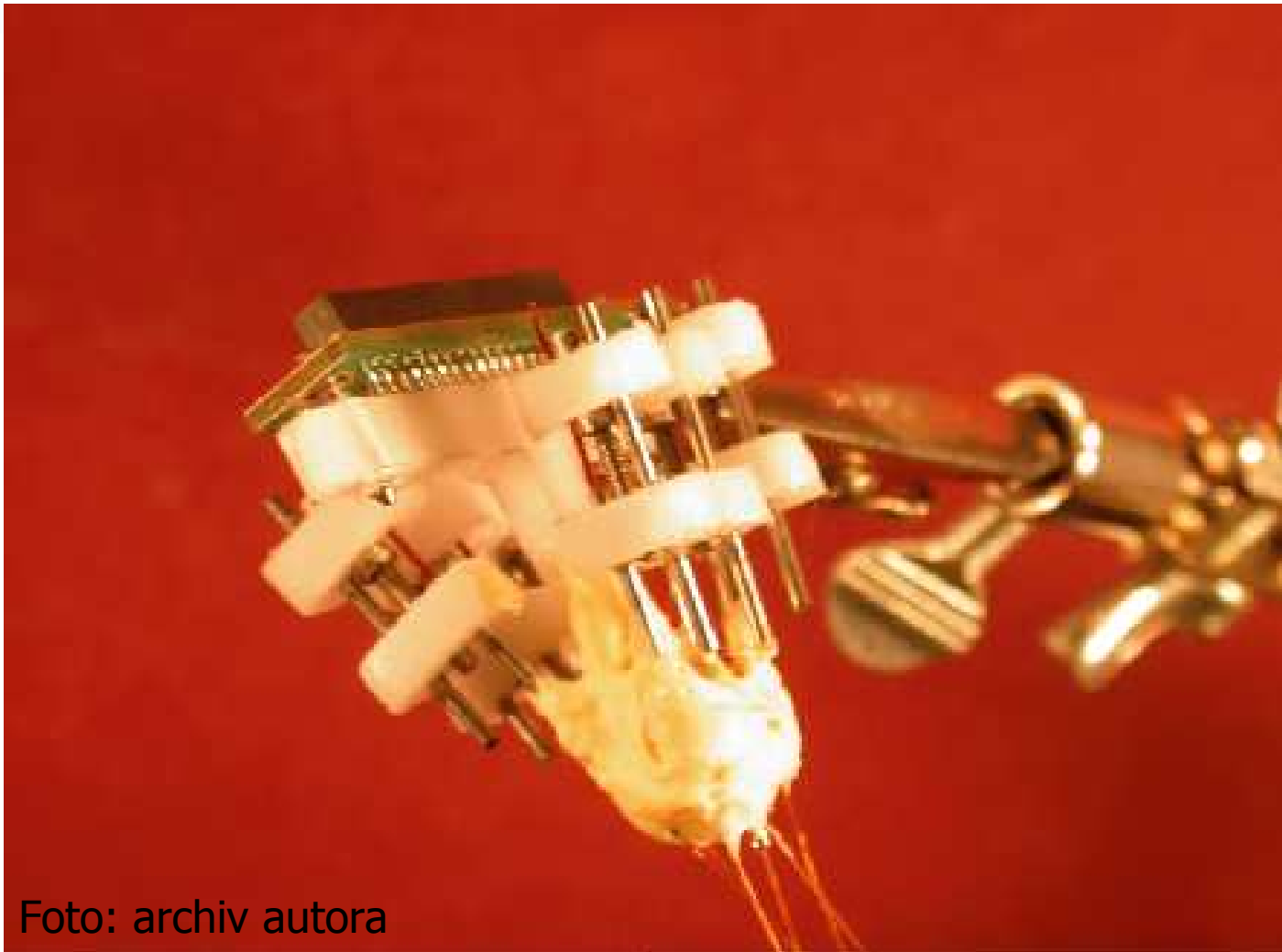


Foto: archiv autora

Tetrodes & microdrives

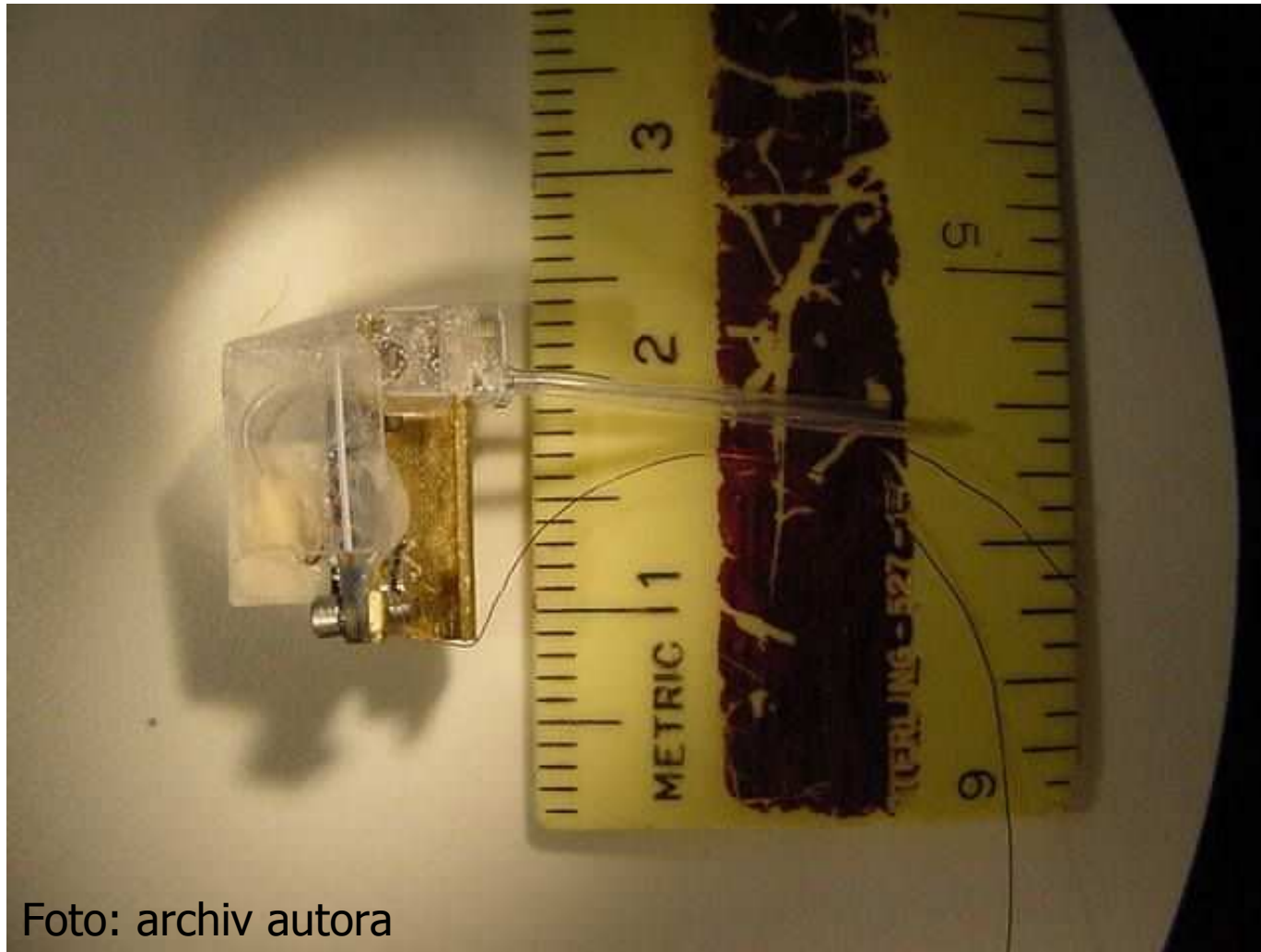
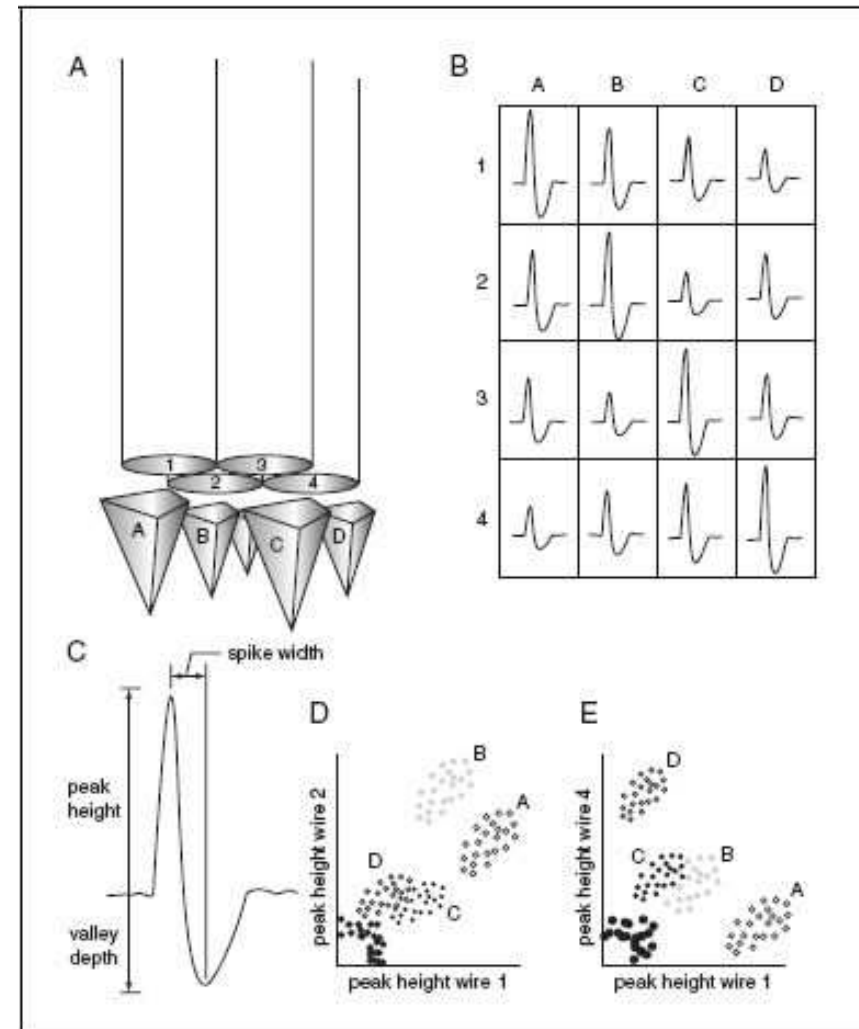


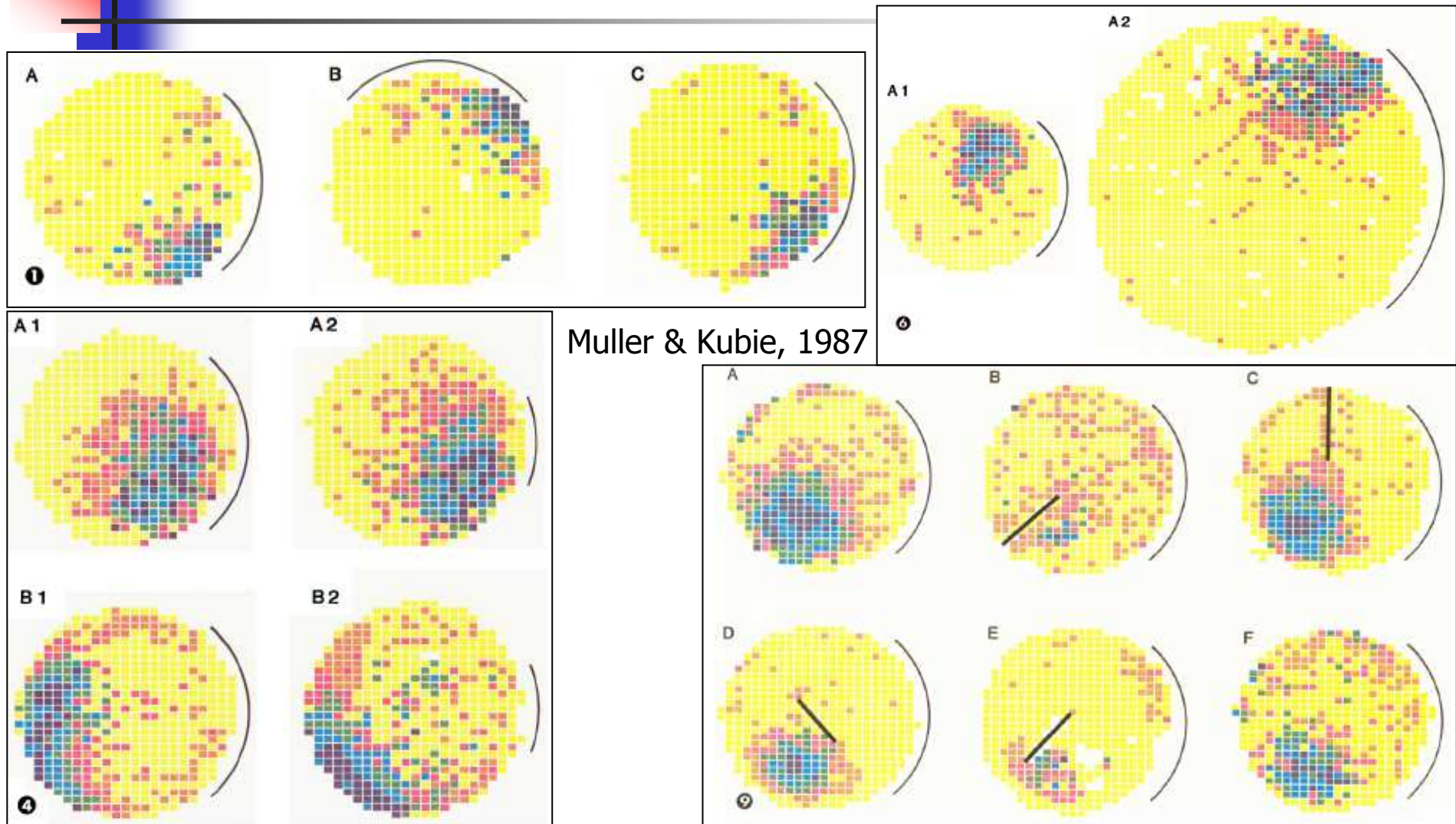
Foto: archiv autora

Multiunit recording

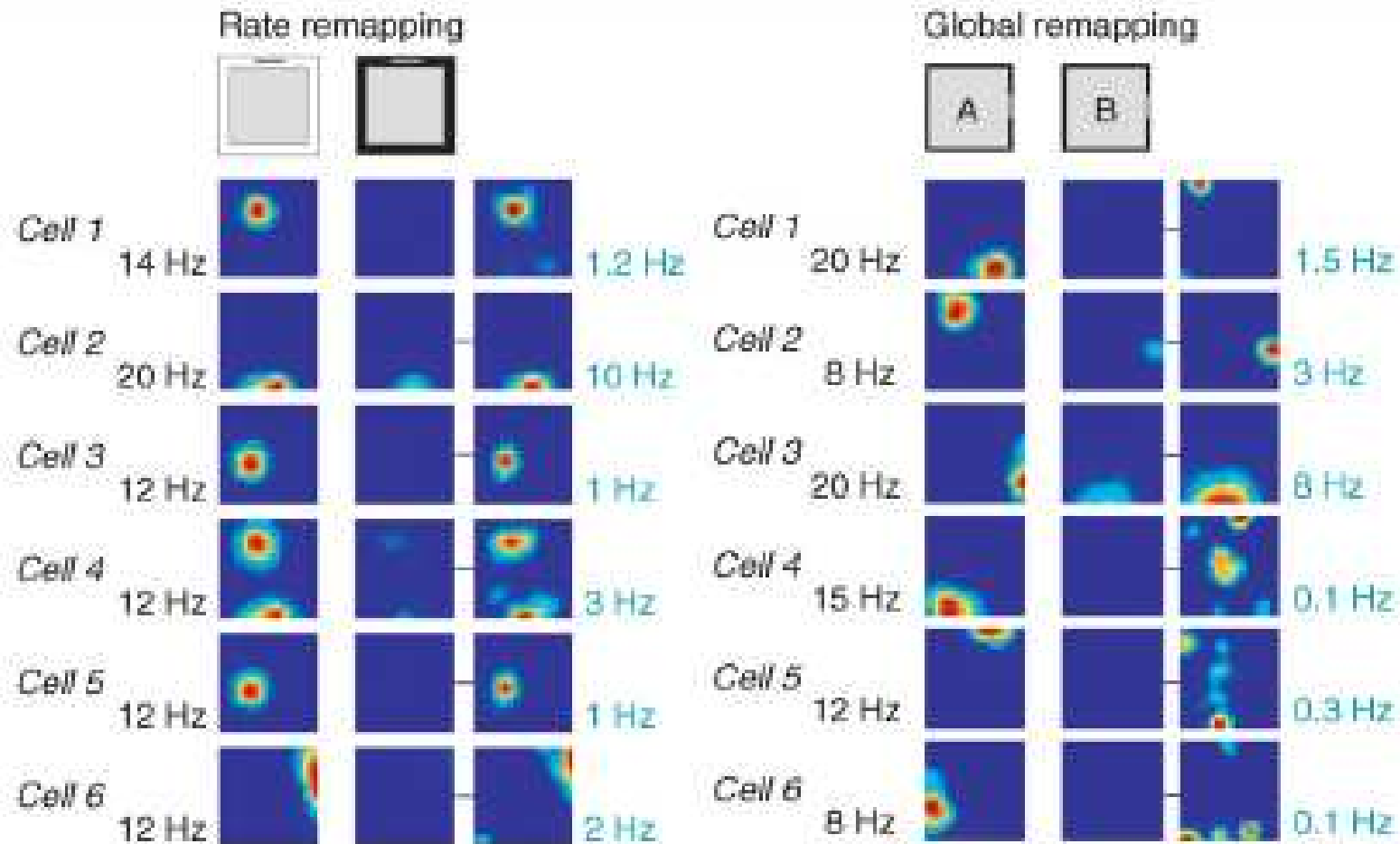
- Všechny 4 elektrody (12.5 - 25 μ m) jedné tetrody „vidí“ stejné neurony, ale každá trochu jinak.
- Spiky z jednotlivých neuronů vytváří shluky (clusters).



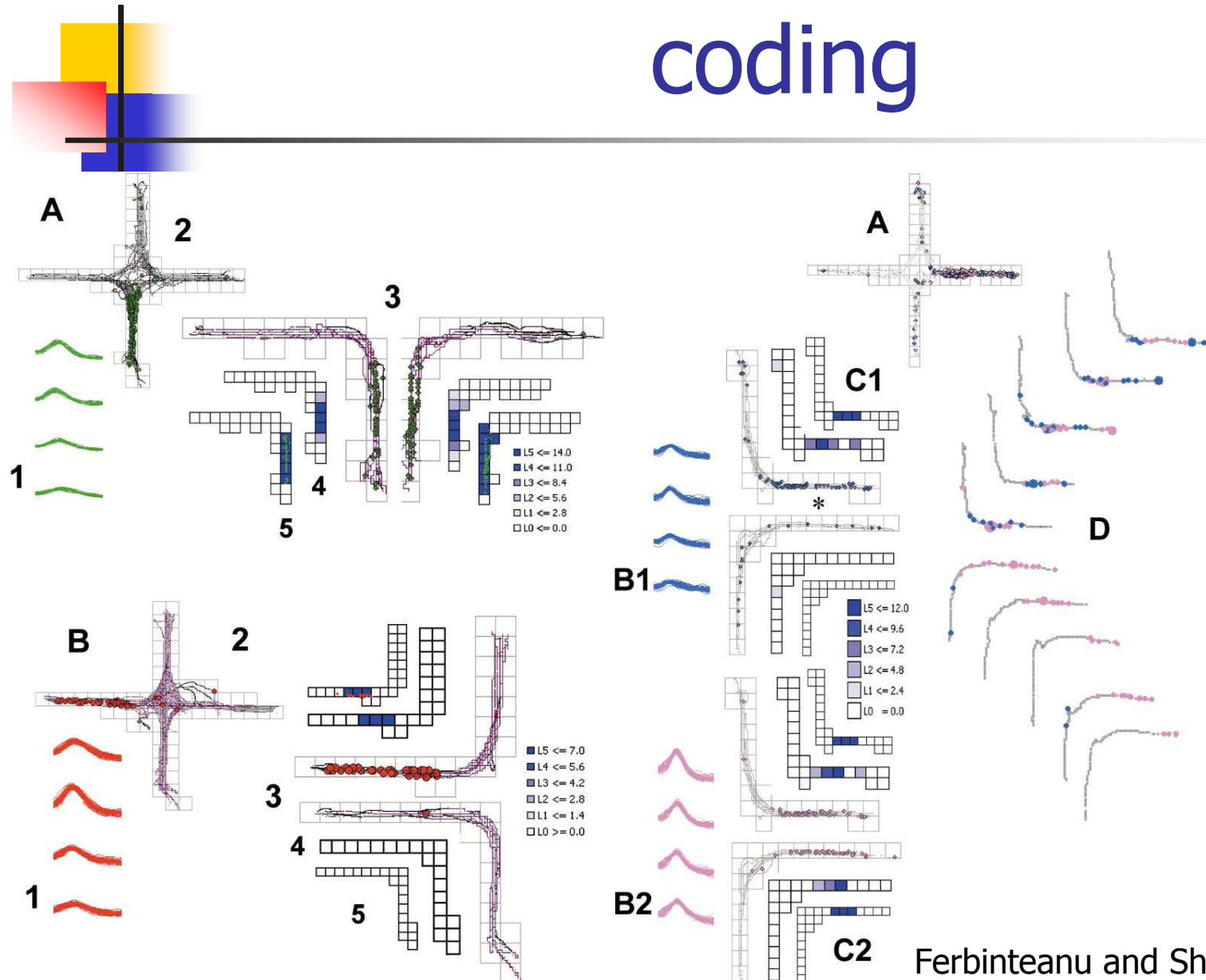
Aktivní mapy (Firing rate maps) a změny v prostředí



Remapping



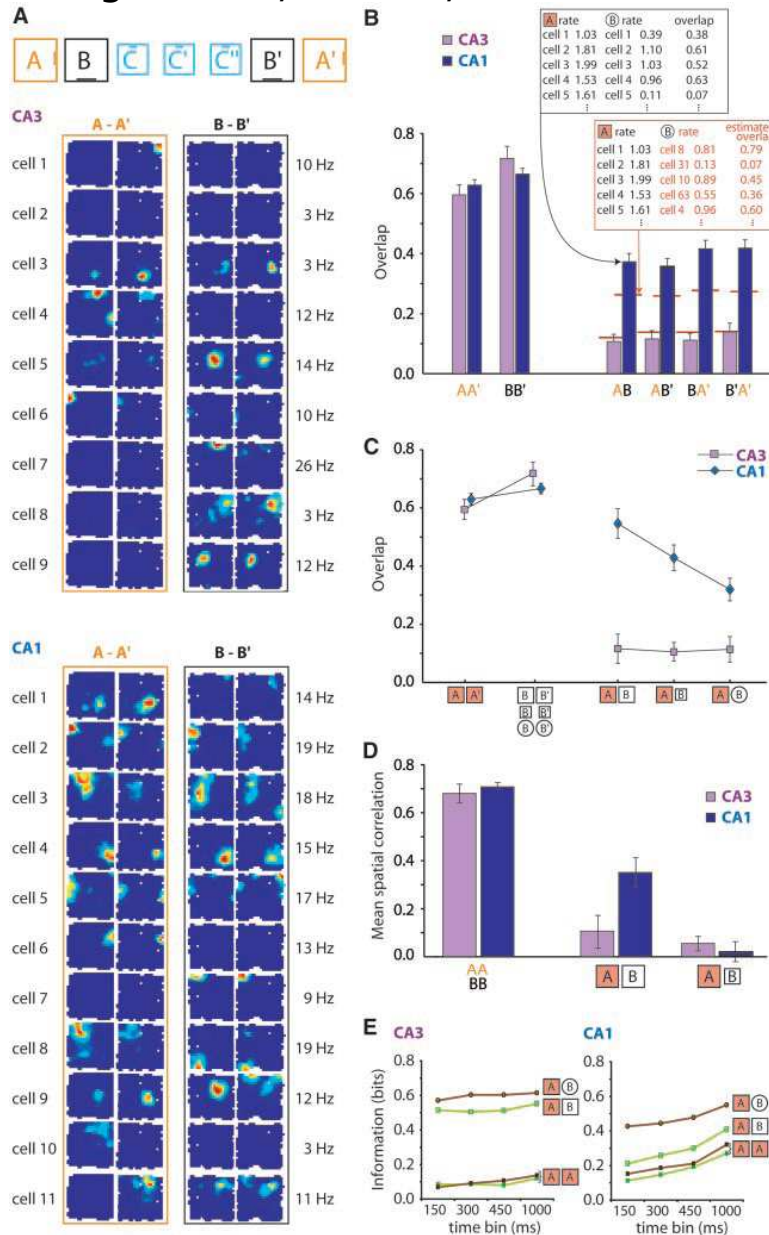
Prospective and retrospective coding



CA1 a CA3 reagují odlišně na změny prostředí

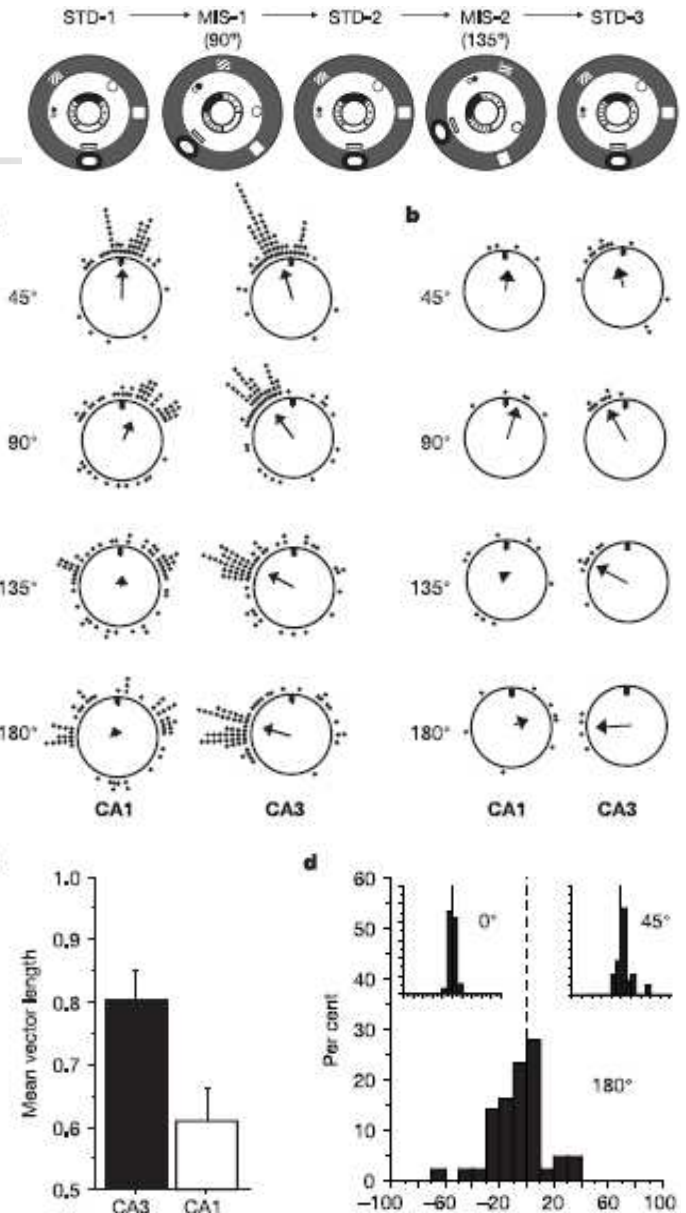
Leutgeb et al., Science, 2004

Lee et al., Nature, 2004

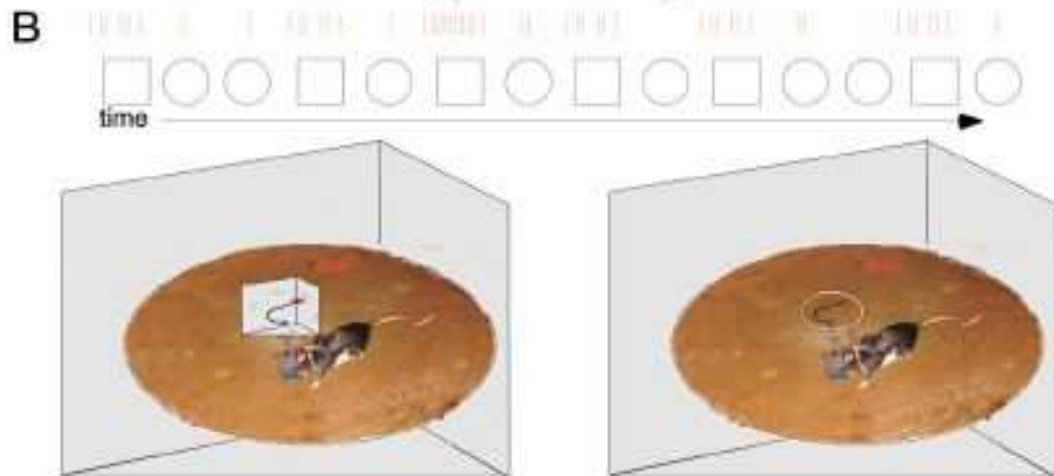
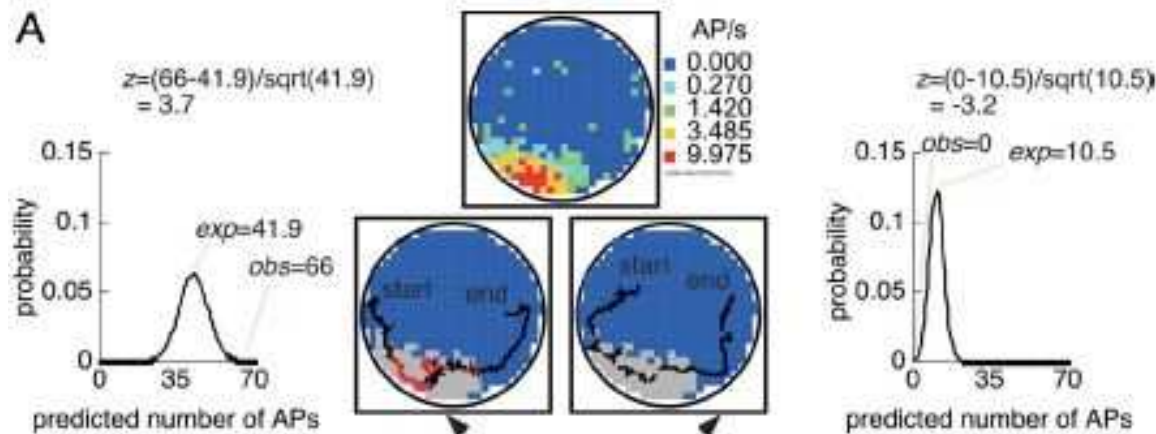


prostředí

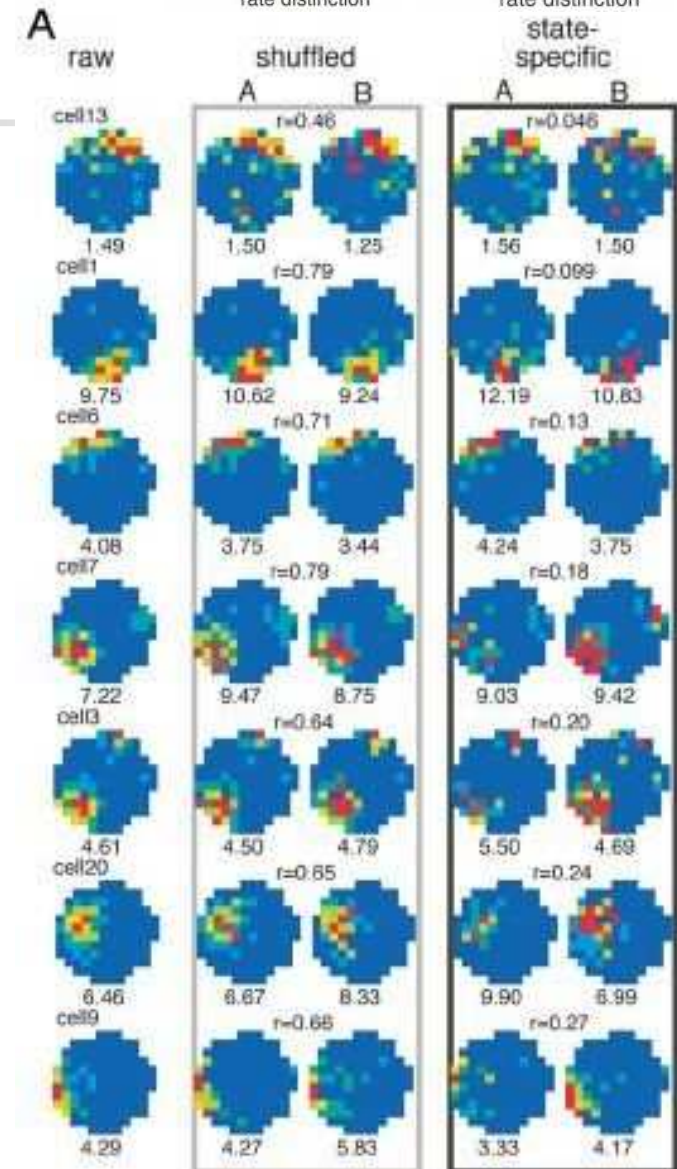
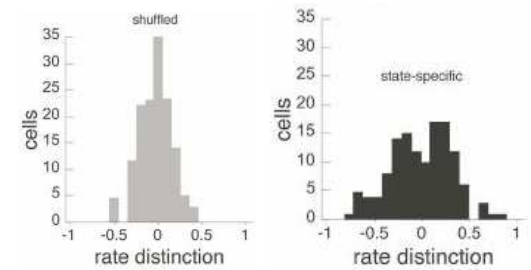
V jedné studii reagovaly na změnu prostředí více neuronální ansámby v CA3 (vlevo), v jiné práci byla změna naopak více vyjádřena v aktivitě neuronů v CA1 (vpravo).



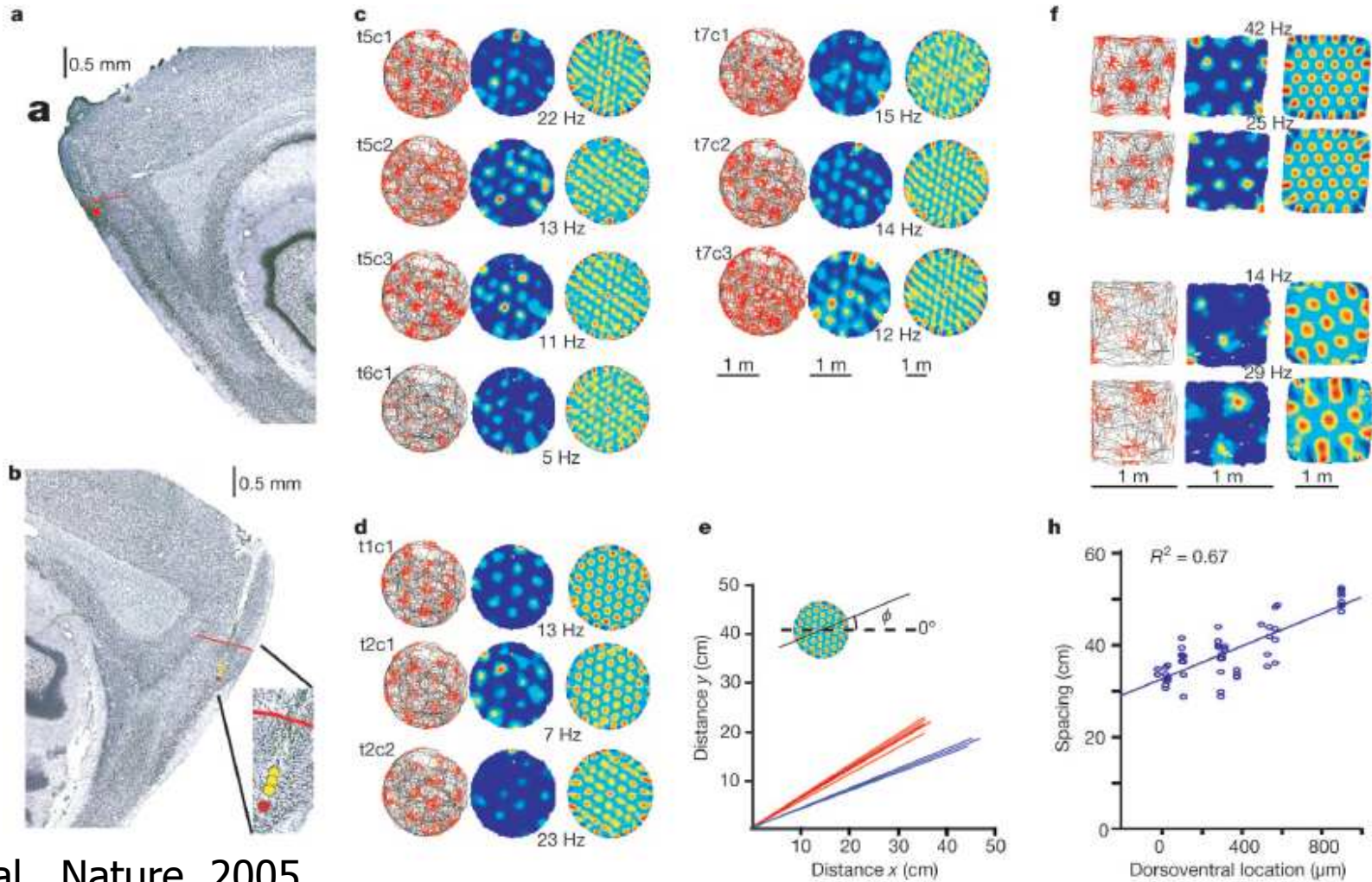
Overdispersion



Fenton et al., J Neurosci, 2010



Entorhinal grid cells



Hafting et al., Nature, 2005



Lézové studie

- Léze permanetní
 - Aspirační
 - Chirurgické
 - Termokoagulační
 - Excitotoxické
 - Selektivní neurotoxiny
- Dočasné inaktivace – funkční léze
 - TTX a ostatní blokátory iontových kanálů
 - AMPA antagonista CNQX
 - Agonisté inhibiční neurotransmise – muscimol
- Genetické manipulace



Lézové studie

- Genetické manipulace

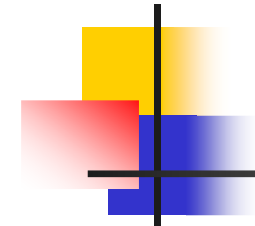
- Umožňují „vypnutí“ určitého genu nebo naopak vnesení genu cizího.
- Důsledkem může být inaktivace specifické buněčné struktury nebo populace určitého buněčného typu
 - Knock-out a knock-down
 - Germline KO
 - Selective KO
 - Cre recombinase
 - Inducible KO
 - Tet-O system



IEG imaging

- Nervová aktivita spouští expresi genů časně odpovědi (immediate-early genes – IEGs) v neuronech
 - C-fos, zif268/erg/....., Narp, BDNF, **Arc**, **Homer1a**
- RNA
 - in situ hybridization
 - Radioaktivní
 - **Fluorescenční** - FISH
 - qPCR
 - Northern blot
- Protein
 - Immunohistochemistry
 - Western blot

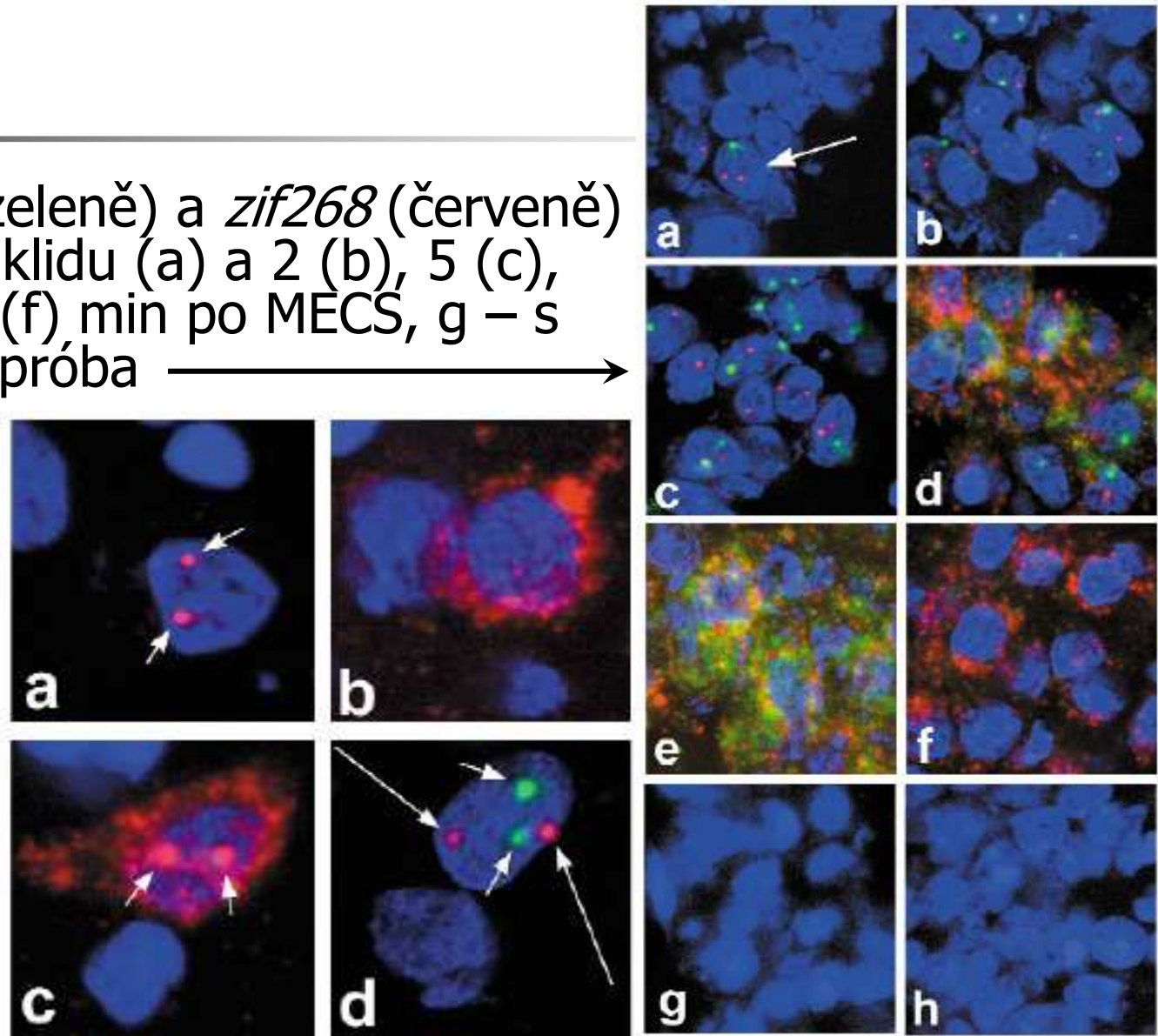
Immediate-early genes (IEGs)



Expresse IEGs *Arc* (zeleně) a *zif268* (červeně) v CA1 neuronech v klidu (a) a 2 (b), 5 (c), 15 (d), 30 (e) a 60 (f) min po MECS, g – s RNázou; h – sense próba

Různé druhy IEG signálu: *Arc*
Intranuclear foci - INF (a); *Arc* - cytoplasmic (b); double-positive *Arc* signal (c); double label *Arc* (zeleně) a *zif268* (červeně)(d)

Guzowski et al., 1999



Arc a dlouhodobá plasticita

- Applikace (ODNs) po tréninku též poškozuje

- Když se Arc igaměně KO

- Exprese Arc proteiny je důležitá pro udržení LTP a prostorové vodní bludiště

hipokampu (e) a jednoduché (f) strachové podmínování, podmíněná chuťová averze (g) a detekce novelt/habitace (h)

Guzowski et al., 2000, J Neurosci

PRE-TRAINING, SESSION ONE, SESSION TWO

TRAINING, PROBE



Plath et al., 2006, Neuron

- Inhibice exprese Arc infuzí antisense

oligodeoxynukleotidů

(ODNs) poškozuje udržení

LTP (LTP maintenance) na

synapsích perforující dráhy

(PP) v gyrus dentatus (DG)

pozdní fázi LTP na PP-DG

in vivo antisense ODNs

na synapsích Schafferových kolaterál v

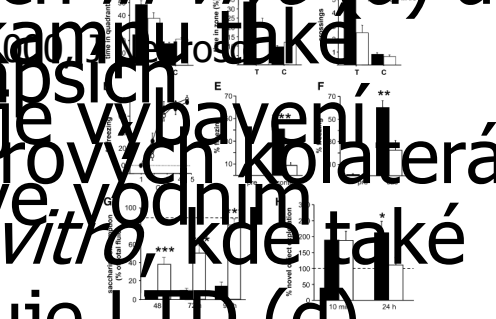
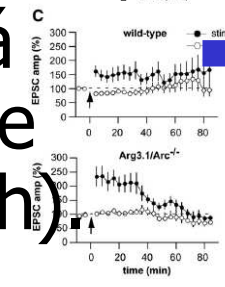
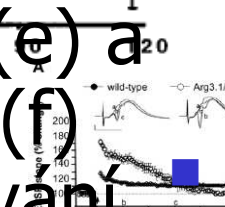
paměti ve vodním bludišti

CA1 *in vitro*, kde také

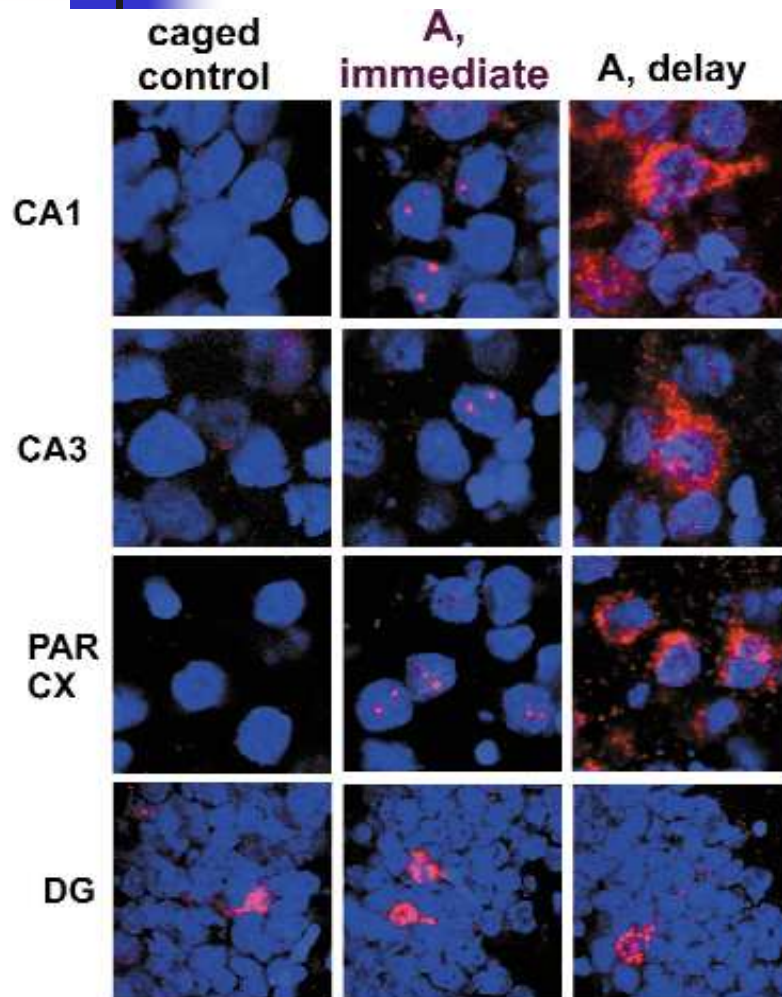
poškozuje LTD (d).

Guzowski et al., 2000, J Neurosci

Plath et al., 2006, Neuron



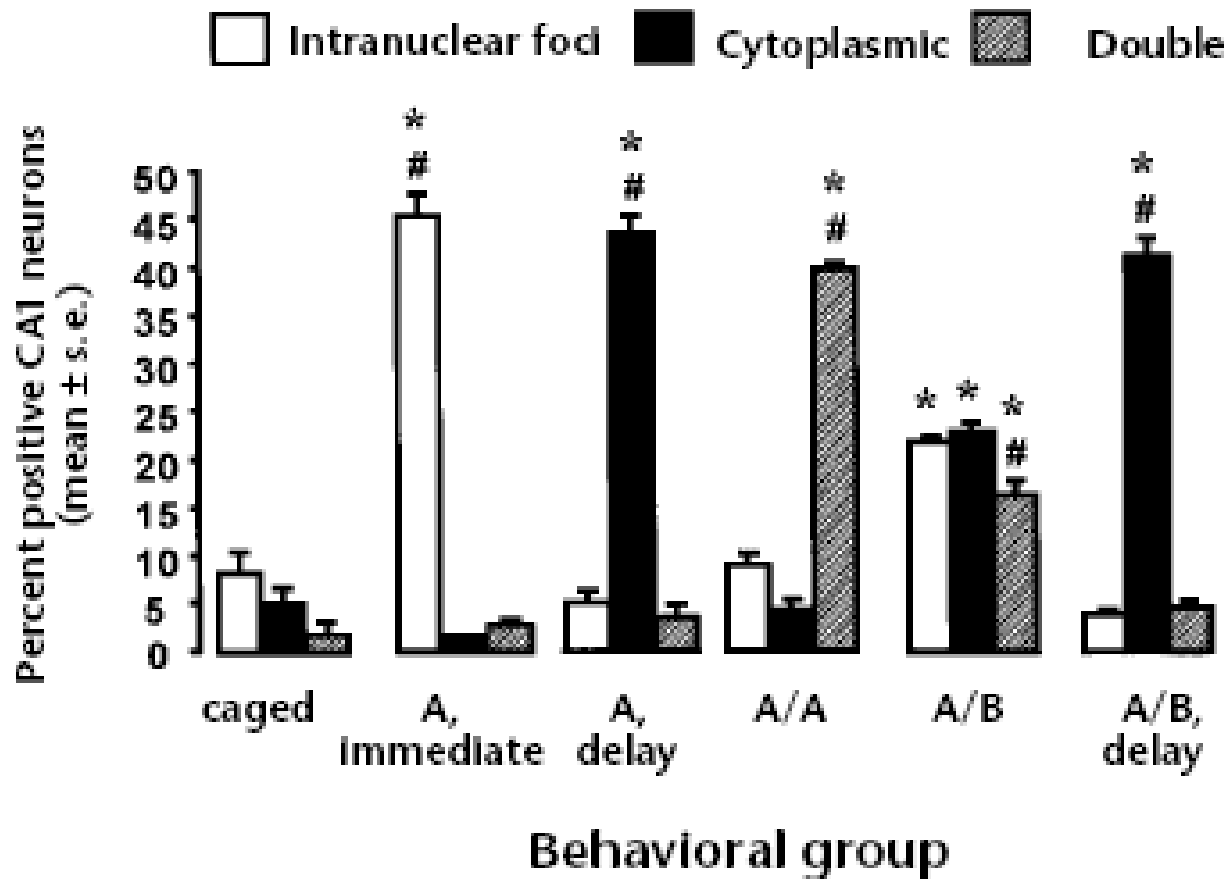
Cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence *in situ* hybridization - catFISH



- Intranukleární exprese *Arc* (primární RNA transkript) se objevují v jádrech neuronů v CA1, CA3 a v kortexu okamžitě po exploraci prostředí A.
- Po 25 minutách se *Arc* mRNA objevuje v cytoplazmě.
- Nízká exprese *Arc* v DG se nemění.

Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci

catFISH ukázala specificitu IEG signálu ke zpracovávané informaci

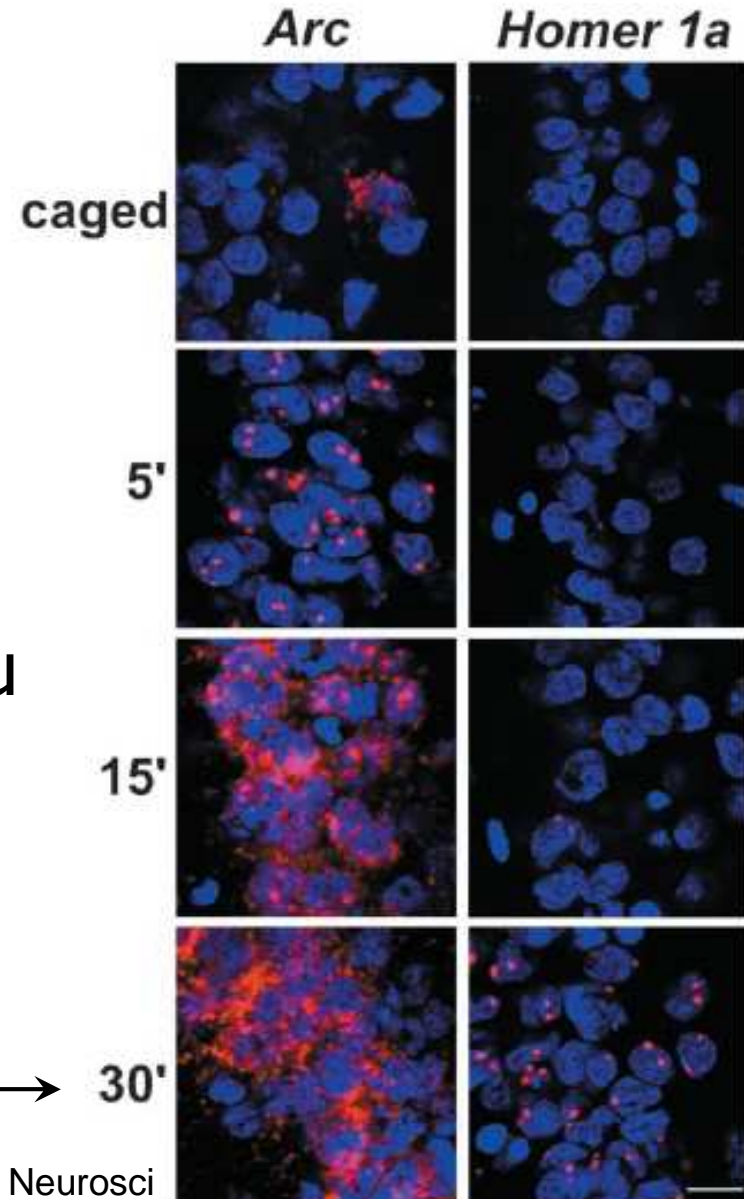


Arc signal je specifický k behaviorálnímu kontextu: stejné neurony jsou aktivní ve stejném prostředí A, ale odlišné populace jsou aktivní v různých prostředích A/B.

Zpožděný výskyt signálu z IEG

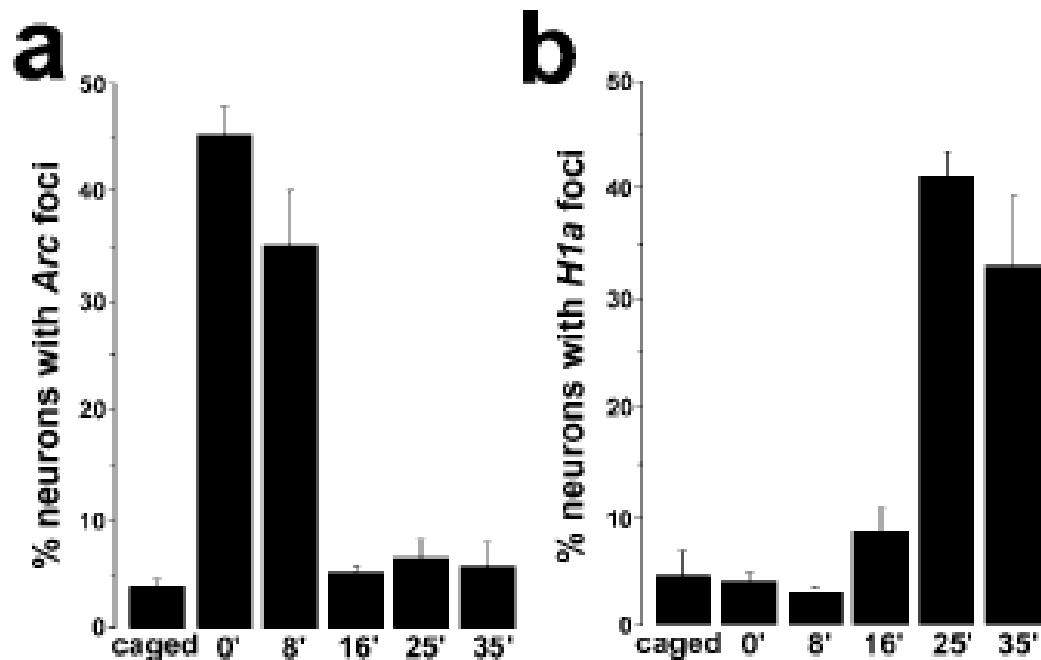
Homer1a po MECS

- Intranukleární signál *Homer1a* se objevuje 30 minut po indukující stimulaci (MECS).
- Toto zpoždění je dáno pozicí próby na 3'UTR na primárním transcriptu (~40 kb od počátku transkripce) a omezené elongační rychlosti RNA polymerázy II (~1.4kb/min).
- INF *H1a* se časově shoduje s cytoplasmatickým *Arc*. →

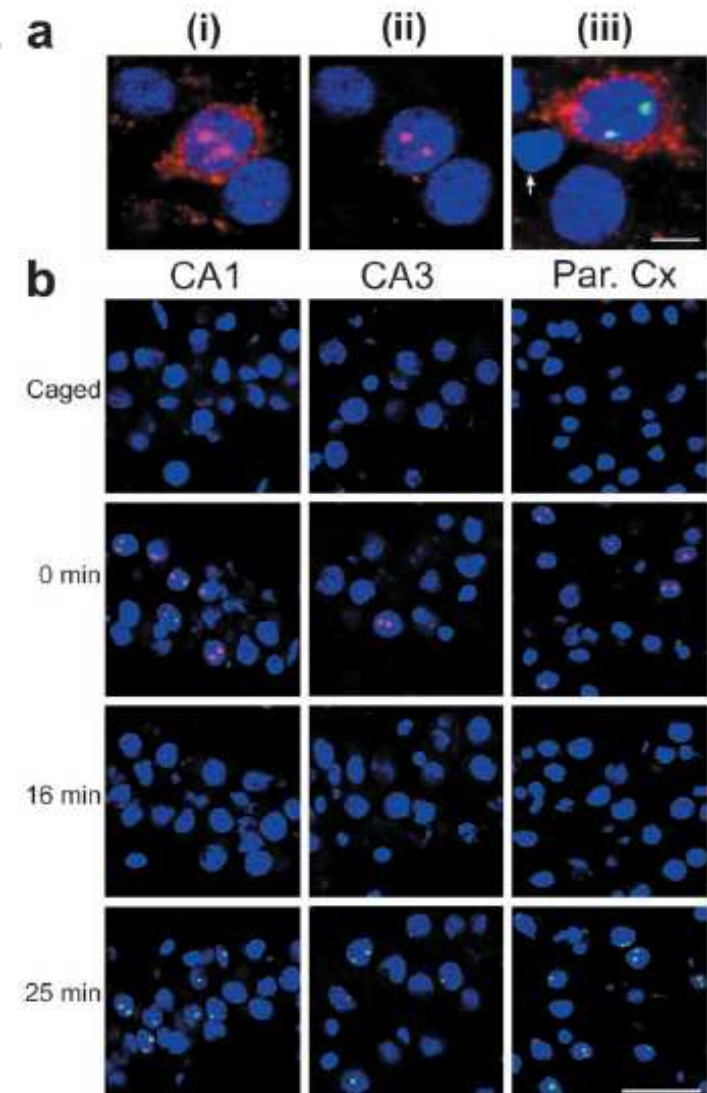


Intranukleární signály *Arc* a *Homer1a* mapují aktivitu v různých časových úsecích

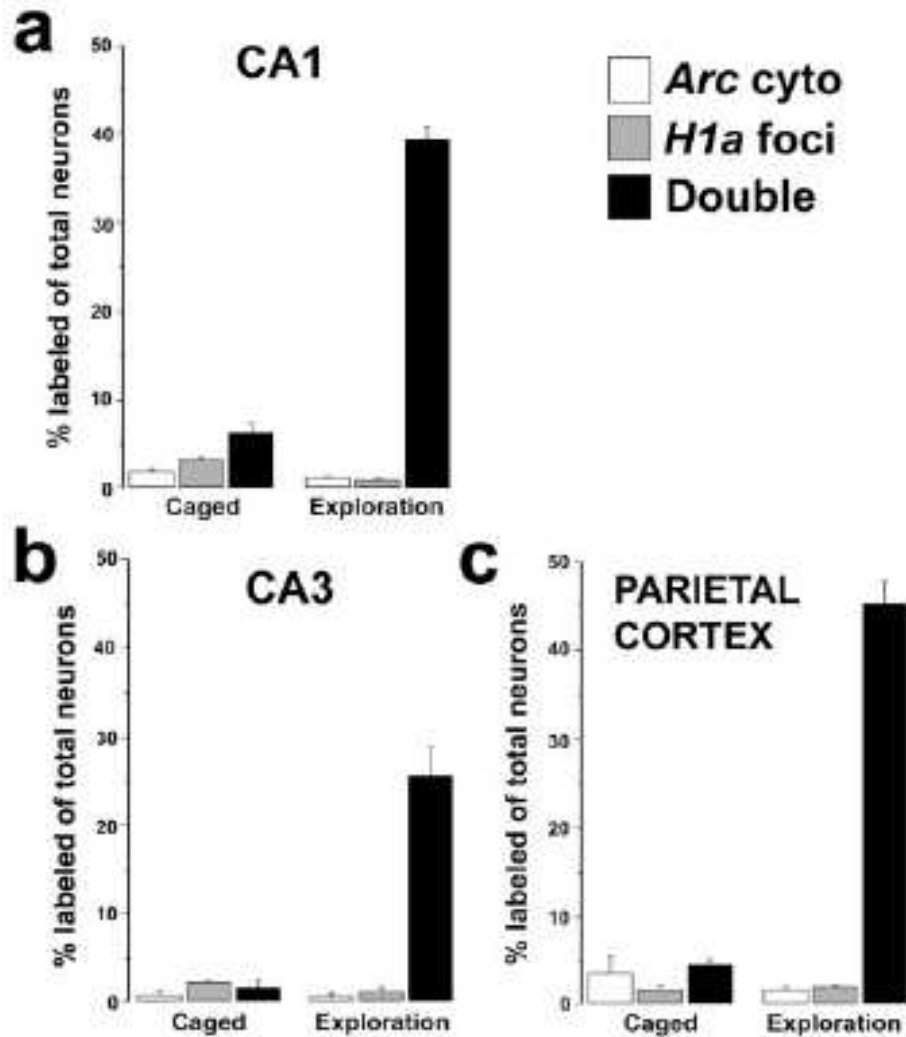
- Časový odstup *Homer1a* signálu (zeleně) je zachován i po exploraci nového prostředí (open field).



Vazdarjanova et al., 2002, J Neurosci

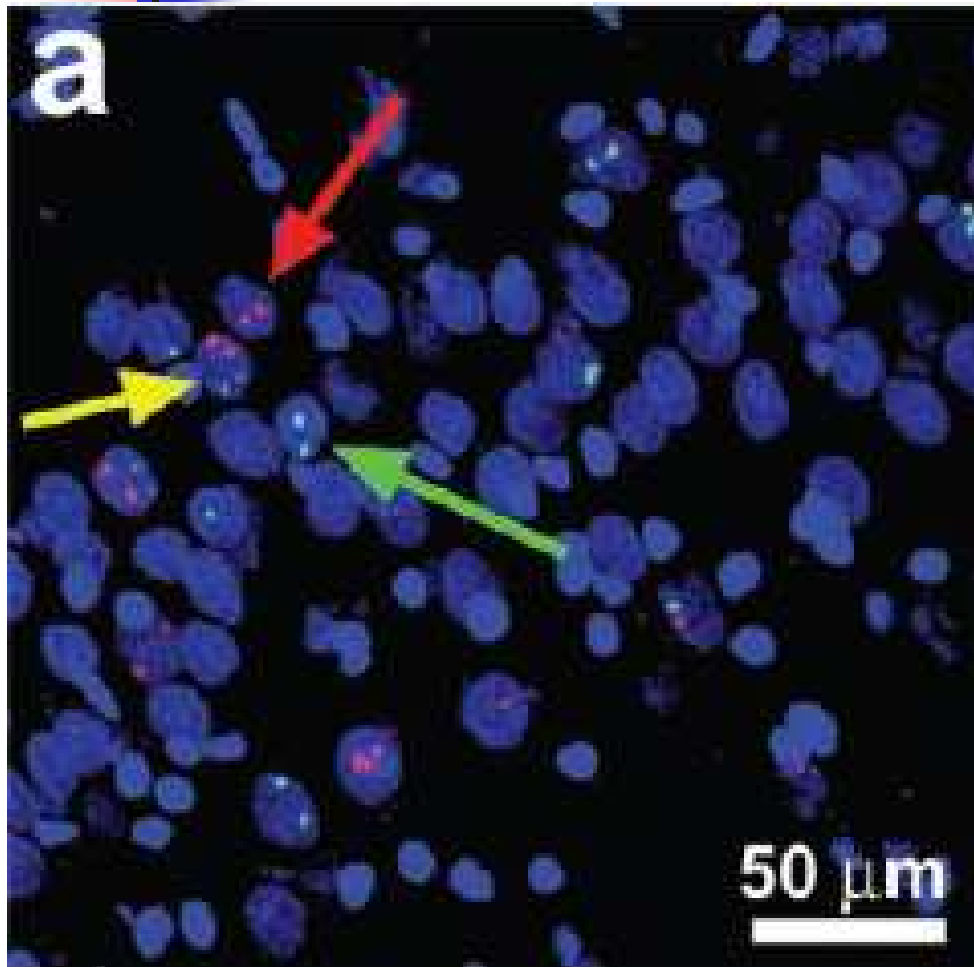


Intranukleární signál *Homer1a* se překrývá s cytoplazmatickým *Arc*



- Intranukleární signál *Homer1a* se objevuje ve stejných neuronech jako cytoplasmatický *Arc*.
- To umožňuje modifikaci metody catFISH: aktivita během první behaviorální epizody je detekována pomocí *Homer1a* INF a druhá prostřednictvím *Arc* INF.

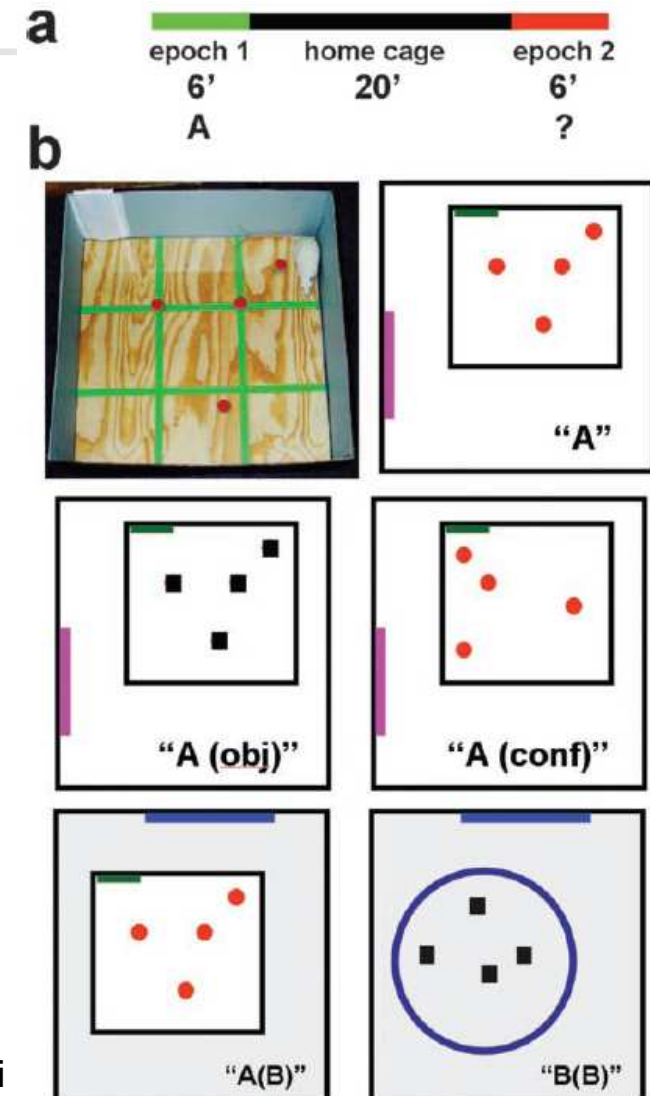
Arc/Homer1a catFISH



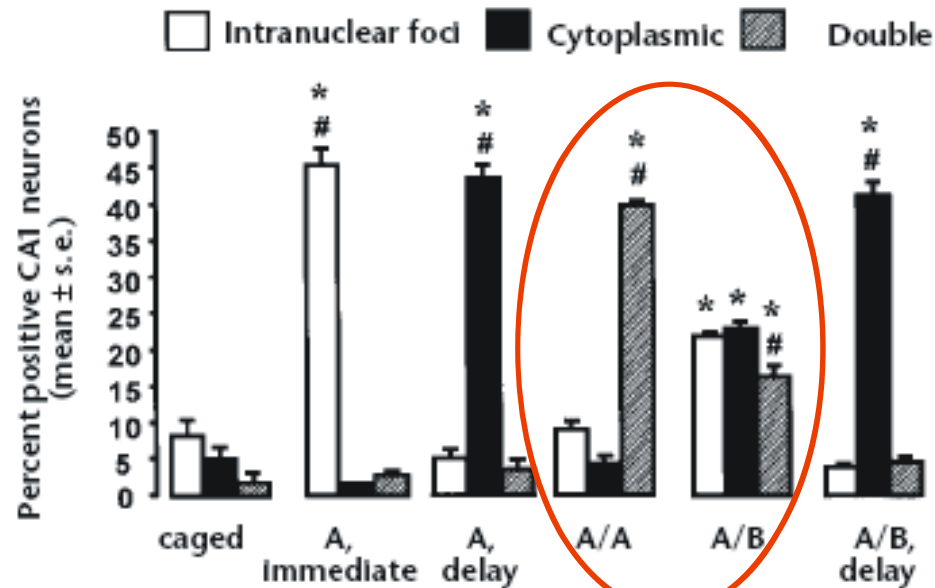
Homer1a (zelený INF) značí neurony aktivní během první epizody ~25-30 min před smrtí zvířete. *Arc* (červený INF) značí neurony aktivní během druhé epizody bezprostředně před usmrcením. Double-pozitivní neurony byly aktivní během obou epizod.

Změny v prostředí

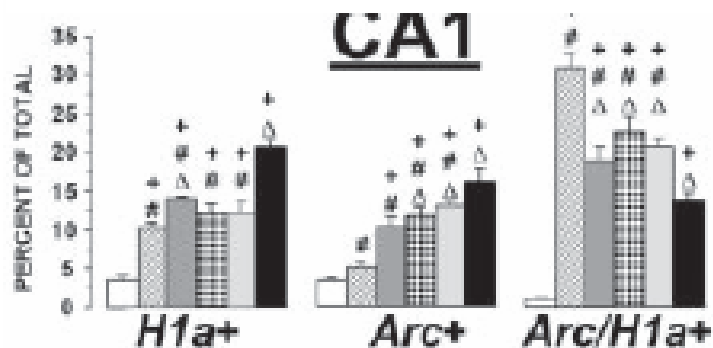
- Zvířata byla vypuštěna na 6 min jednou v prostředí A, navracena do svých klecí, a 20 min později podruhé vypuštěna v tomtéž prostředí A, v modifikovaném prostředí A' buď s jinými objekty Aobj, s jiným uspořádáním stejných objektů Aconf, anebo s jinými vzdálenými orientačními značkami Ab, anebo v úplně jiném prostředí B.
- Kontrolní zvířata (caged controls - CC) zůstala ve svých klecích po celou dobu.



CA1 a CA3 reagují odlišně na změny v prostředí



Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci

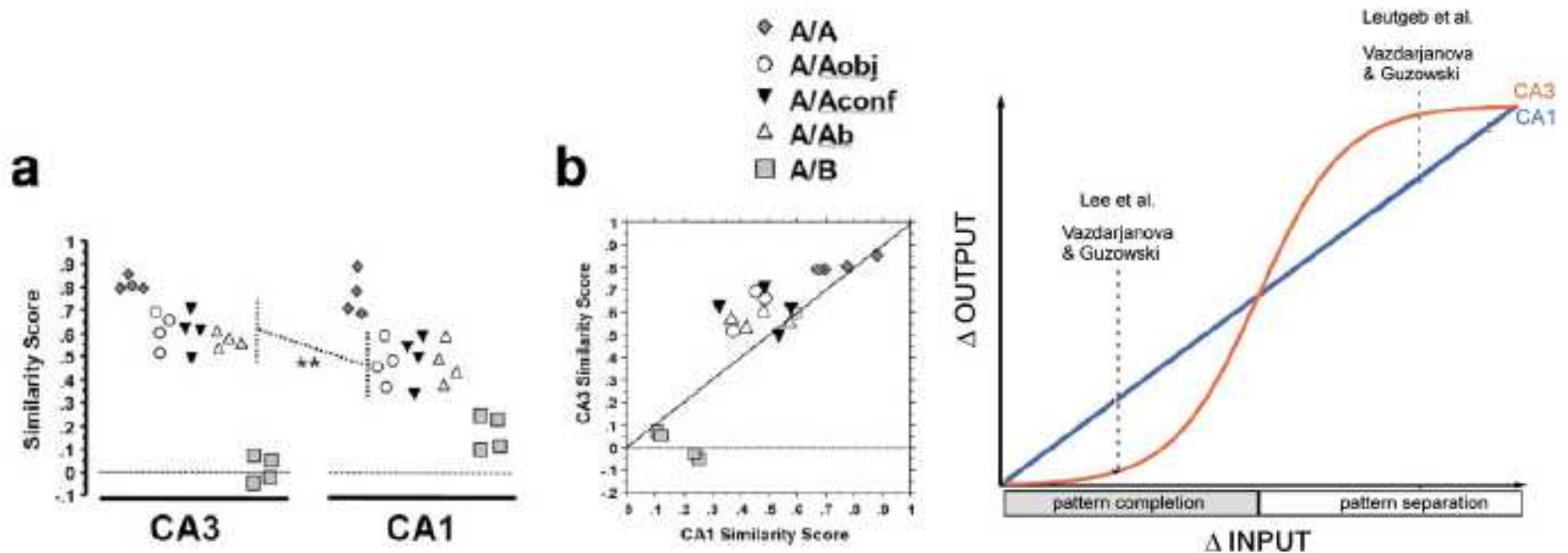


Vazdarjanova and Guzowski, 2004, J Neurosci

- Téměř ty samé neuronální ansámby (**neural ensembles**) byly aktivní ve stejném prostředí (A/A) v CA1 i v CA3.
- Statisticky nezávislé skupiny byly aktivní v různých prostředích (A/B) v CA3, zatímco v CA1 nadále přetrvávala jistá podobnost skupin.
- Při mírných změnách (A/A') byla podobnost vyšší v CA3 než v CA1.

Neuronové sítě v CA3 a CA1 mají různé vlastnosti

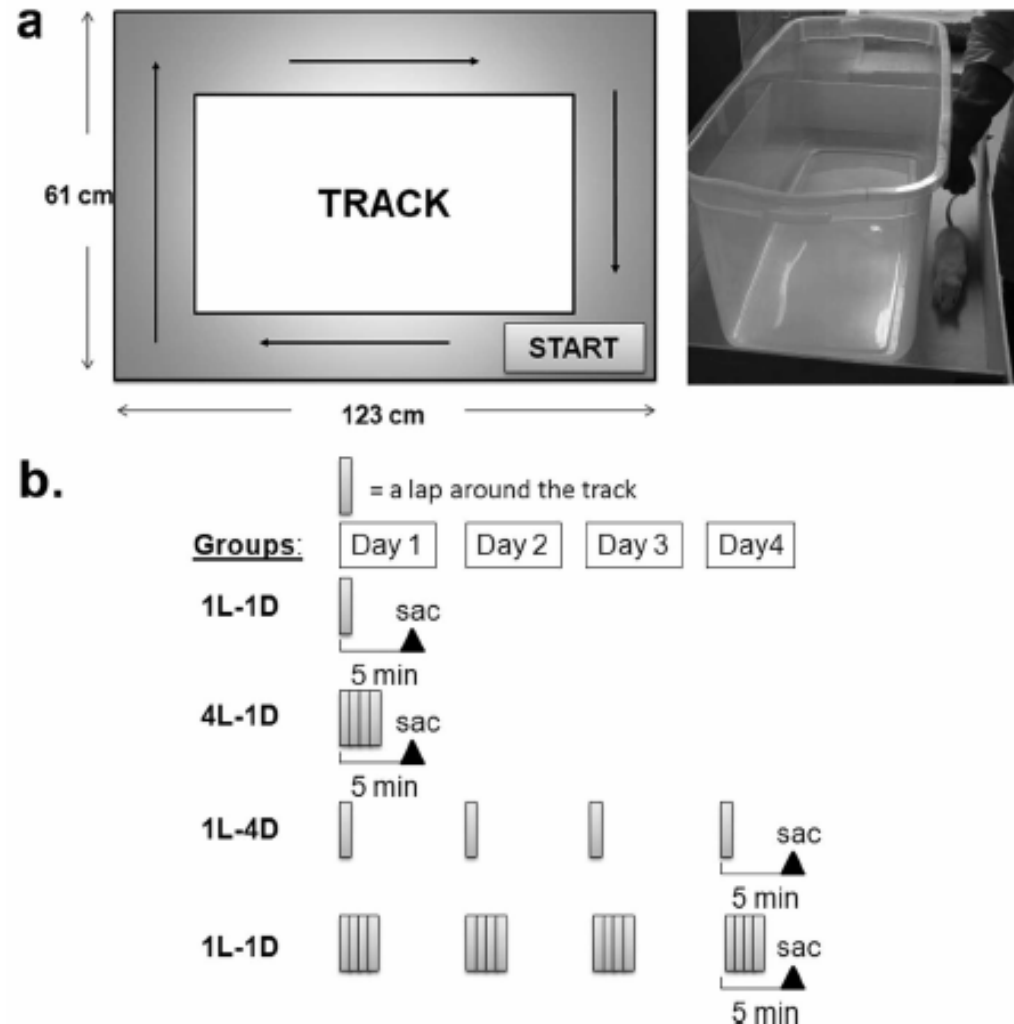
Odpověď na změnu v prostředí je v CA1 pozvolná a stupňovitá, zatímco v CA3 je výrazně nelineární a blíží se dvěma stavům buď totožných aktivních neuronových skupin, nebo skupin zcela jiných. To ukazuje na dynamickou rovnováhu mezi separací vzorců (pattern separation) a doplněním vzorců (pattern completion) v CA3, ale ne v CA1.



Kolik aktivity je třeba ke spuštění exprese *Arc*?

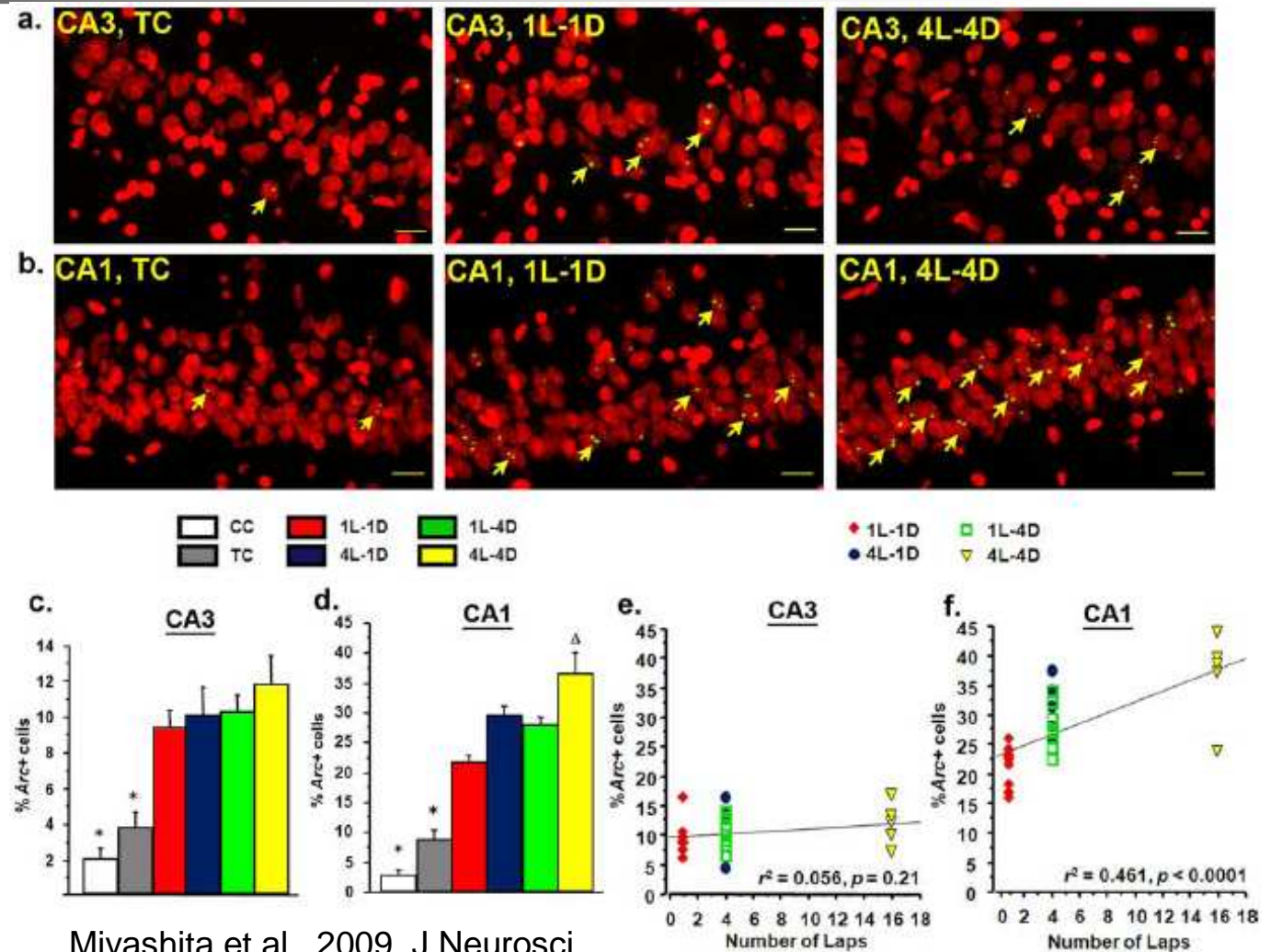
- Track maze (dráhové bludiště) – v každém kole projde potkan každým místem trasy právě jednou.
- Je aktivita spojená s jedinou návštěvou míst podél této dráhy dostatečná ke spuštění exprese *Arc*?
- Posílí opakování tuto expresi?

Miyashita et al., 2009, J Neurosci



Jedinečná zkušenost stačí ke spuštění exprese *Arc* v hipokampu

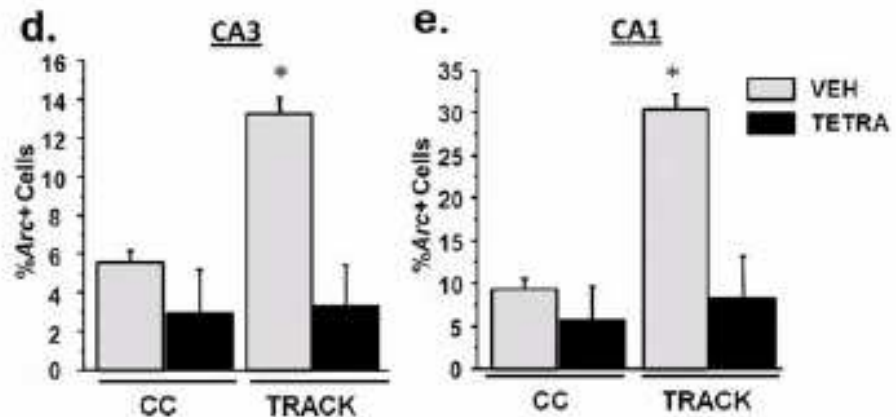
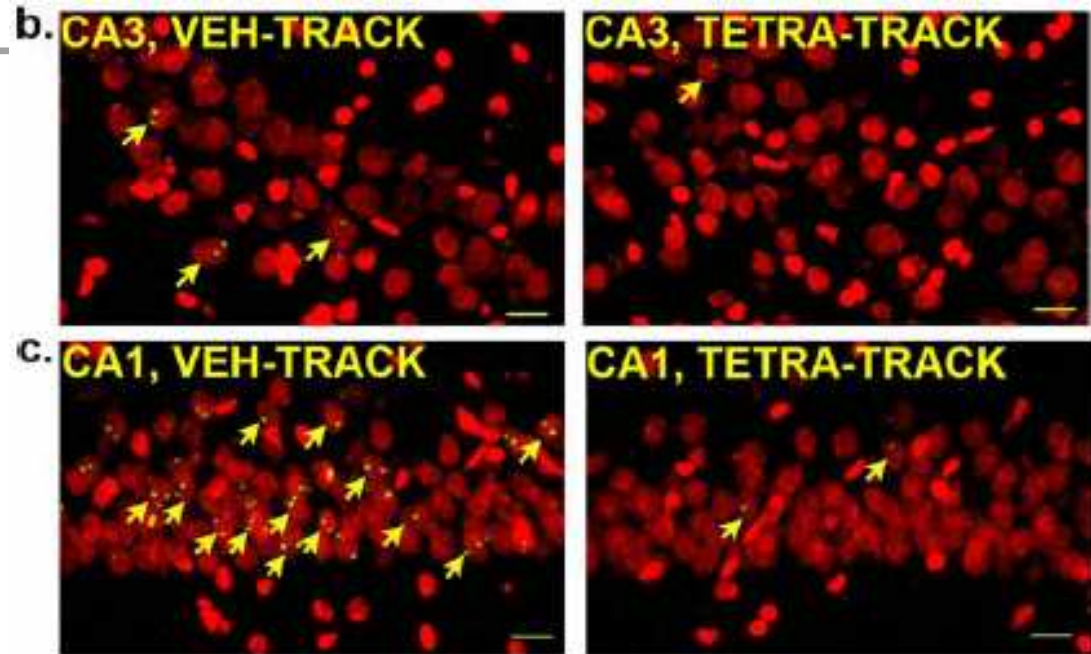
- Úplné skupiny CA3 neuronů exprimují *Arc* už po prvním kole.
- Jedno kolo spustilo expresi *Arc* také v CA1, ale další kola rozšířila skupinu aktivních CA1 neuronů.
- *Arc* může být součástí molekulární kaskády od neuronální aktivity k paměti.



Stačí "place cell" aktivita sama o sobě ke spuštění exprese *Arc*?

- Inaktivace mediálního septa (MS) narušuje učení a plasticitu v hipokampu, ale prostorově specifická aktivita v CA1 je zachována.
- Inaktivace MS zcela eliminovala behaviorálně indukovanou expresi *Arc* v hipokampu.

Miyashita et al., 2009, J Neurosci





Exprese *Arc* v hipokampu se může podílet na konsolidaci epizodické paměti

- Jednorázová zkušenost je dostatečná ke spuštění IEG exprese v hipokampu.
- Tato exprese souvisí se synaptickou plasticitou a učením, spíše než s pouhou neuronální aktivitou.
- Tato exprese může být základem konsolidace jednorázové paměti v hipokampu.
- Jednorázovost je doménou CA3, zatímco učení v CA1 pokračuje během opakování.