

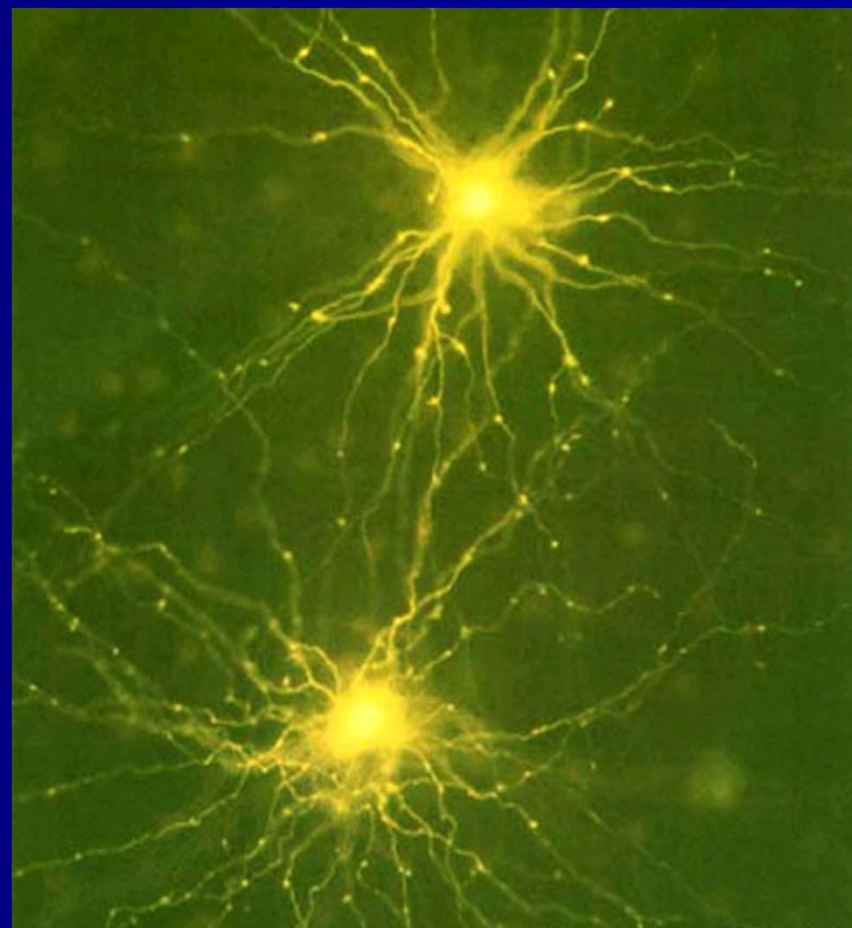
Výběr literatury

- Kandel E.R. et al.: *Principles of Neural Science*, Third edition, Prentice-Hall International Inc., USA, 1991.
- O'Keefe J. a Nadel L., *Hippocampus as a Cognitive Map*. London, Clarendon Press, 1978 – volně stažitelné
- Gallistel C.R. *The Organization of Learning*. Cambridge; MIT Press, 1990. – na vyžádání zkopírovat
- Wishaw, I.Q. *The Behavior of the Laboratory Rat*. Oxford, University Press, 2006
- Veselovský - *Etologie* - spíše zoologicko-etologická úroveň
- Nilsson - *Physiology of Behavior* (na vyžádání)
- Nicolls, Martin et al. - *From Neuron To Brain*
 - Spíše buněčná a molekulární úroveň

Mechanismy paměti

Co se dozvíme tomto modulu?

- Behaviorální koncept paměti
- Fyziologie synaptického spojení
- Mechanismy jednoduchého učení u modelového organismu (Aplysie)
- Synaptická plasticita
- Dlouhodobá potenciace - LTP
- Vztah LTP a paměti



Koncepce paměti jako schopnosti modifikovat své chování na základě zkušenosti

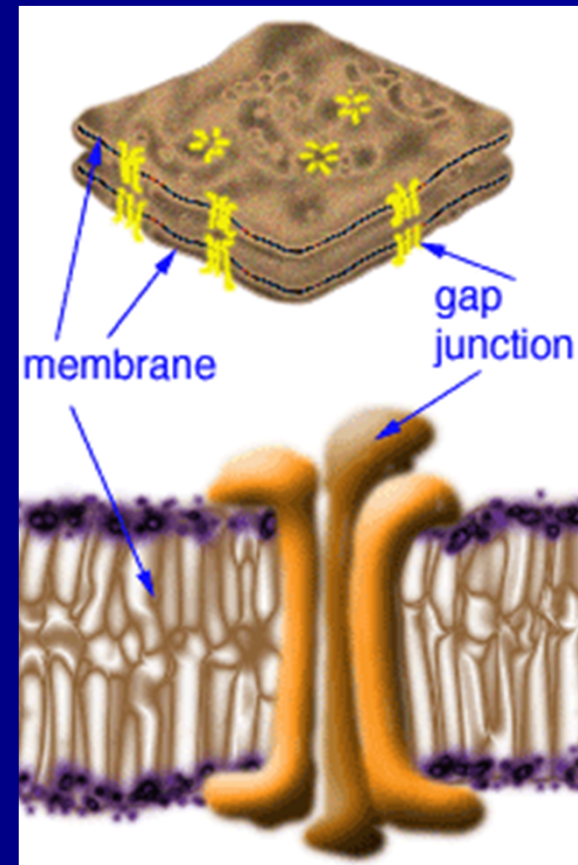
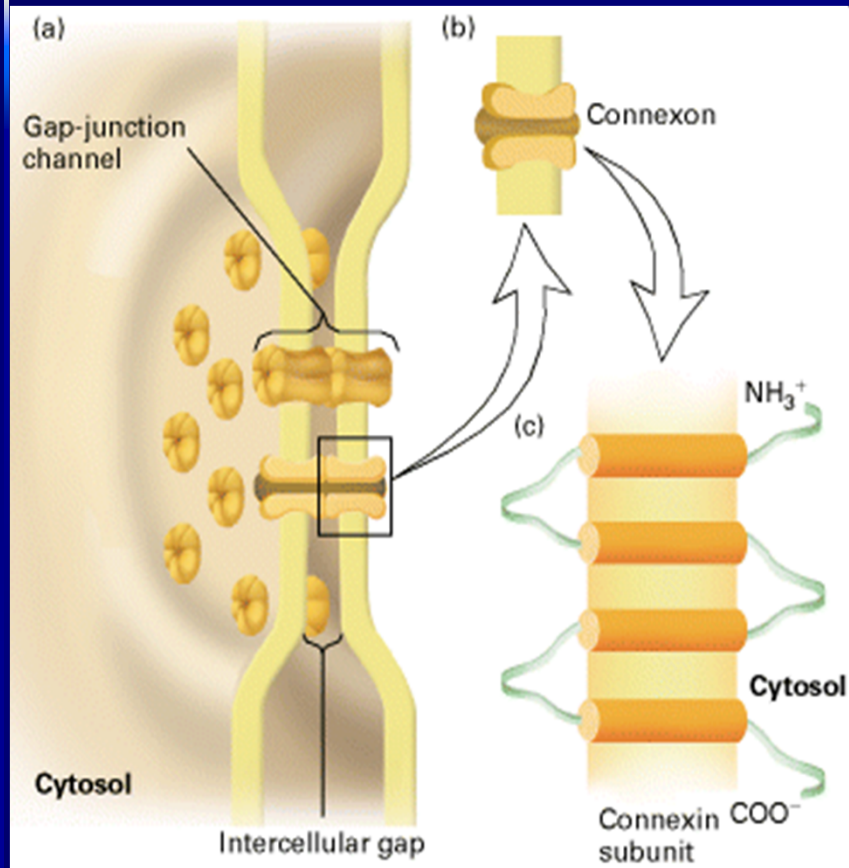
- *We consider learning to be an adaptive change in behavior caused by experience*
- *Memory refers to the internal storage and recall of previously learned behaviors. (Forgetting is the loss of storage or recall.)*
- Modifikace chování má svůj základ v plastických změnách v činnosti nervových spojů (synaptické plasticitě), které jsou podkladem změn v chování

Synapse

Synaptická spojení

- Chemická synapse - příklad nervosvalové spojení - dochází zde k výlevu neuropřenašeče
- Elektrická synapse - *gap junction* - elektrický signál přechází z jedné buňky na druhou - konexinové můstky, v CNS na neuronech, glii, hojně u bezobratlých
- Synaptická plasticita - dobře doložená na chemických synapsích.

Elektrická synapse - gap junction



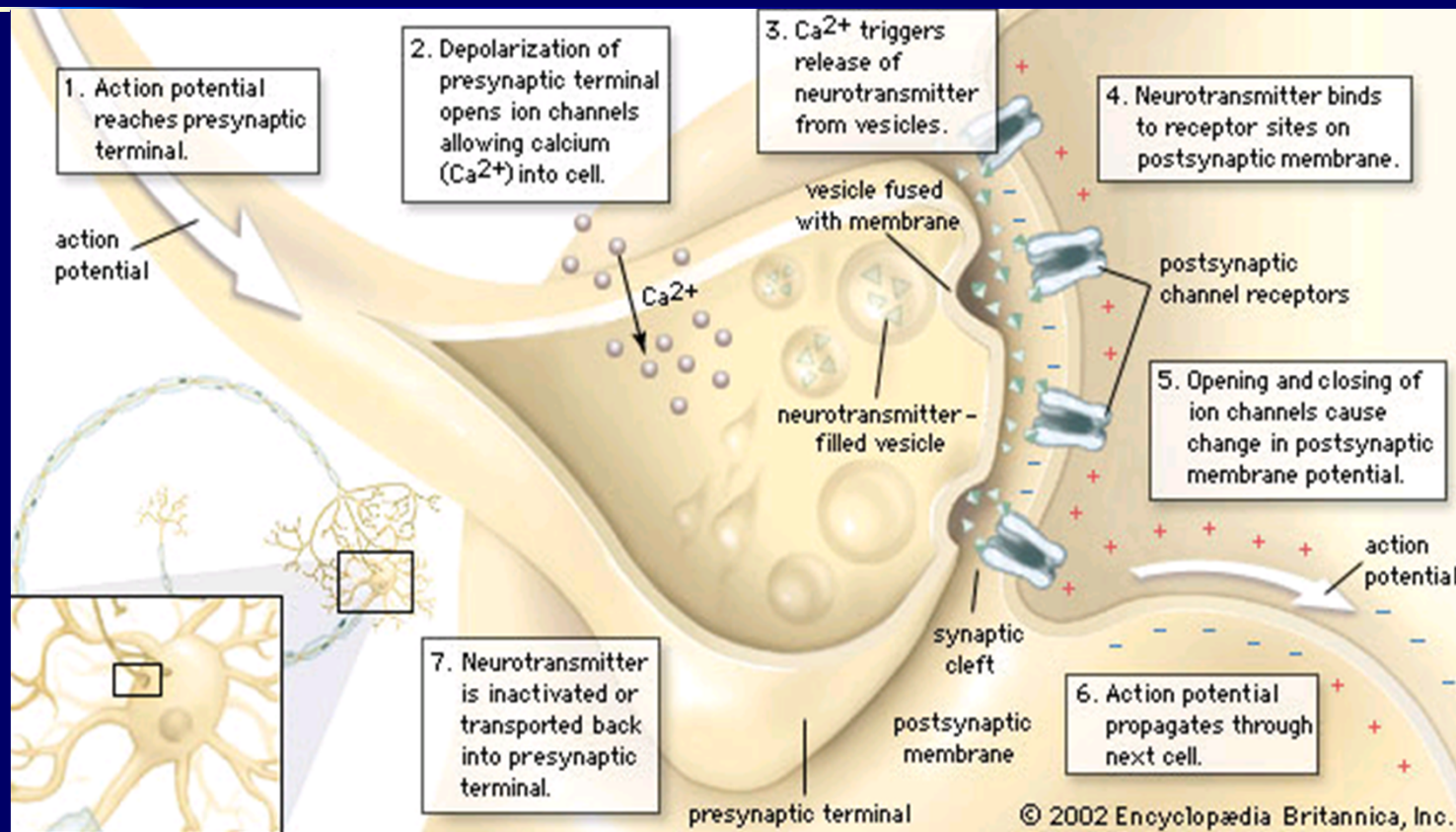
Elektrická synapse - štěrbinovité spojení

- Přímé nízkoodporové elektrické propojení dvou buněk
- - z toho vyplývá - absence synaptického zpoždění, typického pro chemickou synapsi.
- Méně mechanismů pro plasticitu
 - Avšak existují usměrňující *gap junctions*, pro které je vodivost v jednom směru podstatně vyšší než v druhém

Chemická synapse

- Obecně vzato se jedná o spojení jedné nervové buňky s jinou, popř. s jinou efektorovou buňkou (svalovou, žláзовou)
- Lidský mozek obsahuje řádově 10^{14} synapsí (100-500 triliónů)
- Ch.S. Sherrington - autor termínu synapse (řecké „syn“ - spolu a haptain“ - obejmout, stisknout).
- Typický neuron tvoří řádově tisíce synapsí.
 - Axodendritické, axo-axonální, axosomatické, atd.
- Synaptické zpoždění (cca 1ms) - doba potřebná ke vstupu vápníku do zakončení a k fúzi synaptických vezikulů s membránou

Chemická synapse



Chemická synapse

- Akční potenciál na presynaptickém neuronu -> depolarizace nervového zakončení, vstup Ca do zakončení
- Neuropřenašeč skladován v synaptických váčcích (*vesicles*)
- Výlev neuropřenašeče - fúze membrány vezikulu s membránou terminály (SNARE proteiny)
 - Kvantový obsah (uvolněný počet kvant), kvantová velikost (počet molekul v kvantu)
- Difúze neuropřenašeče skrze štěrbinu, vazba na postsynaptické receptory.
- Odpověď

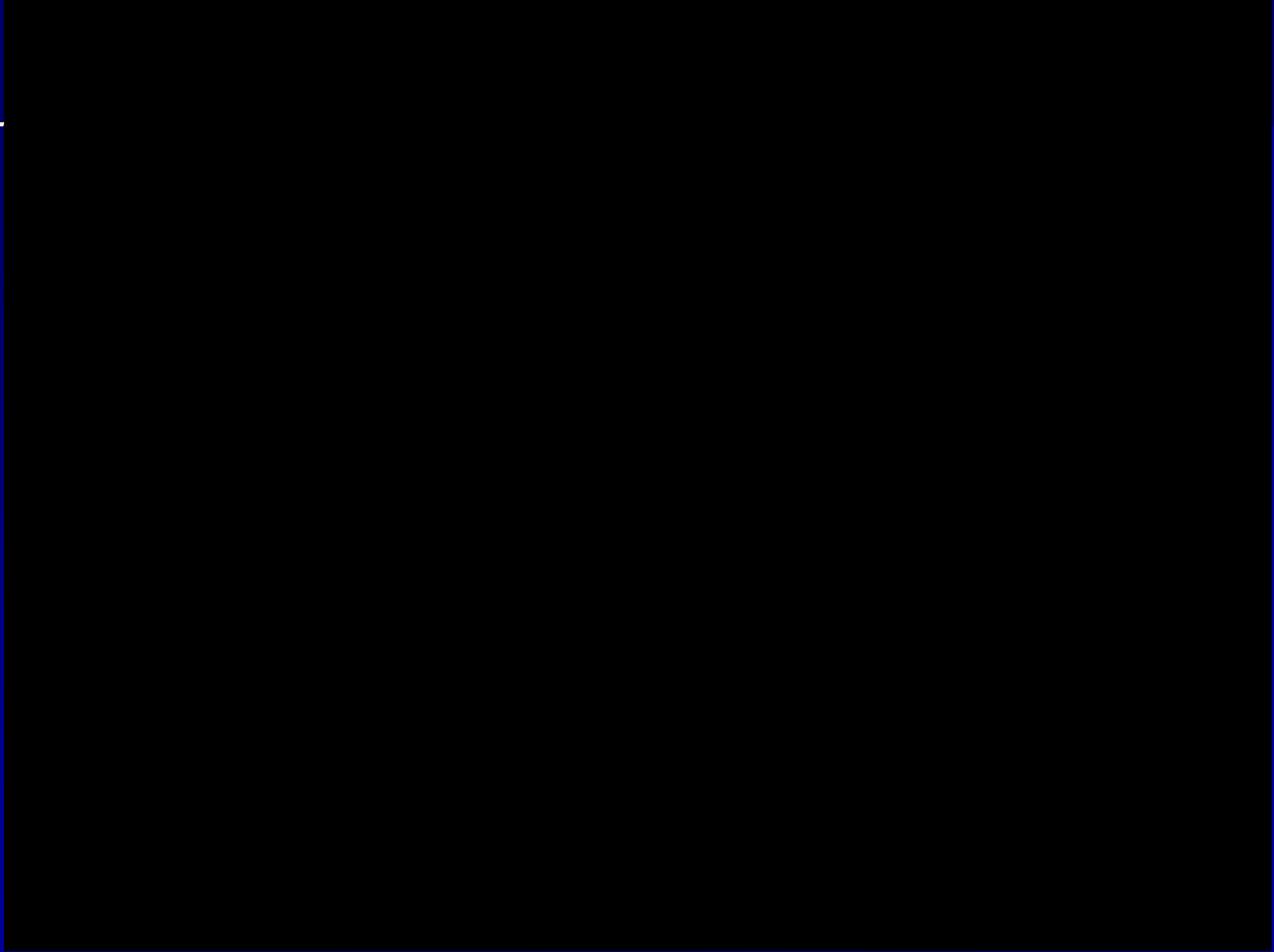
Nervosvalové spojení jako modelová chemická synapse

- Nervosvalové spojení, ploténka (*motor endplate, neuromuscular junction*) - klasický preparát studovaný téměř od poloviny minulého století.
- Motorický axon tvoří synapsi na kosterním svalovém vlákně.
- Přenašečem je acetylcholin, poststynapticky vázán na acetylcholinové receptory nikotinového typu (nAChR)
- Tento přenos je postsynapticky inhibován pomocí kurare
- Výlev Ach blokován např. botulotoxinem (enzymatický jed), interferuje s mechanismem výlevu
- nAChR - ionotropní receptor - tvoří kationtový kanál

Nervosvalové spojení

- Výlev acetylcholinu - 1 váček odpovídá jednomu kvantu - obsahuje cca 30000 molekul Ach
- Evokovaný ploténkový potenciál > výlev mnoha kvant
- Spontánní miniaturní ploténkový potenciál (*miniature endplate potential* - MEPP) - občasný spontánní výlev jednoho kvanta - vyvolá na svalu podprahovou přechodnou depolarizaci
- Ach uvolňován také nekvantově, (*non-quantal release*) - objevitelé Katz a Miledi a současně Vyskočil a Illés. Jedná se o kontinuální sekreci Ach, patrně přes acetylcholinový vezikulární transportér.

Synapse

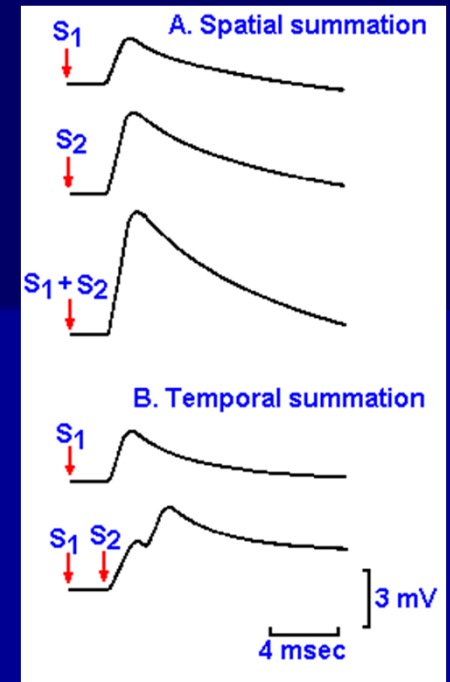
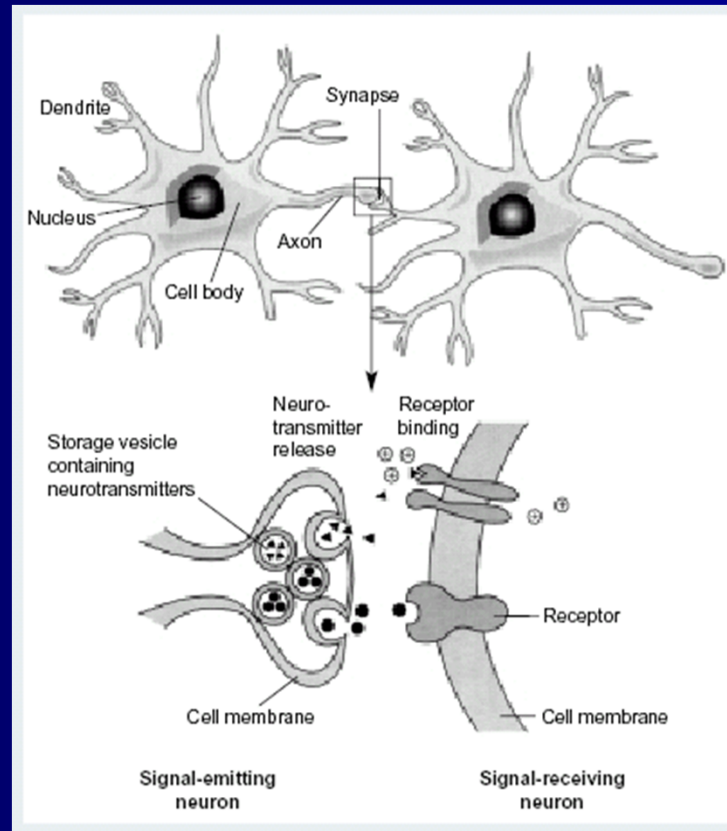


Chemické synapse v CNS

- Na chemické synapsi najdeme řadu cílových struktur na kterých lze zesilovat sílu přenosu (synaptická plasticita)
- Např. zesílení odpovědi receptorů jejich fosforylací, insercí nových receptorů do membrány, desenzitizace receptoru, popř. zvětšením kvantového obsahu presynapticky - retrográdním signálem

Synaptické spojení

- Excitační a inhibiční synapse
- Postsynaptický potenciál
- Sumace časová a prostorová



Stimulus artefact

A population field potential ("EPSP") evoked in the dentate gyrus by stimulating the perforant path

Synaptická plasticita

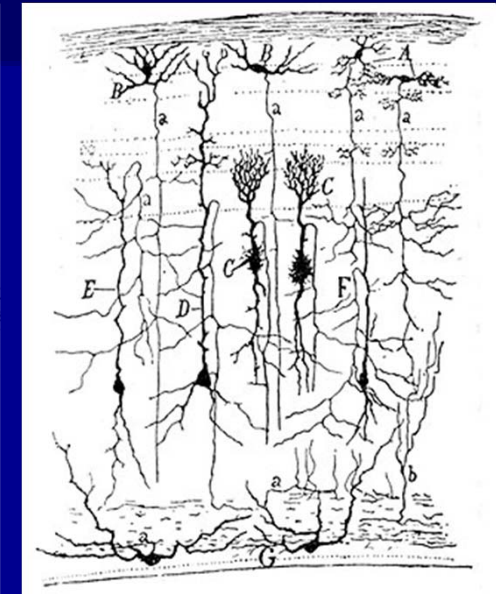
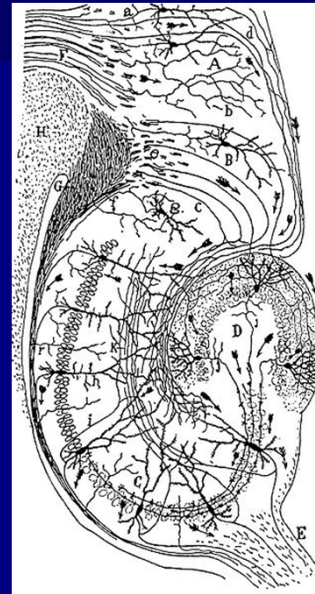
- Je pravděpodobně mechanismem, jakým jsou uchovávány informace v paměti.
- Mohla by být podkladem nejen učení a paměti, ale i dlouhodobějších vzorců chování.
- Plasticita má význam patrně i v drogové závislosti a např. i dlouhodobé a neuropatické bolesti
- Je přístupná experimentálnímu zkoumání, dá se měřit např. elektrofyziologicky

Synaptická plasticita

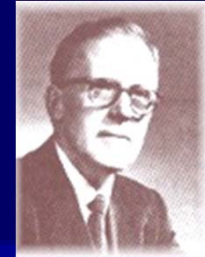
- **Synaptická plasticita** je definována jako schopnost synapse změnit svoji synaptickou sílu (*synaptic strength*) v závislosti na vlastní aktivitě
- **Synaptická síla**
 - je míra změny postsynaptického potenciálu evokovaného aktivací presynaptického zakončení a následným výlevem neuropřenašeče.
 - De facto, účinnost, efektivita synaptického přenosu
- Změna dráždivosti postsynaptické membrány daná opakovanou aktivací presynaptického a postsynaptického neuronu
 - (tato definice se blíží pojetí Hebba).

Synaptická plasticita

- Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) byl v roce 1894 prvním, kdo navrhl představu, že učení není zprostředkováno přírůstkem počtu neuronů, ale ke změně sil spojení mezi těmito neurony.
- Práce Donalda Hebba
- Až do druhé poloviny 20. století neměli vědci nástroje, jak tyto změny měřit



Hebbův zákon



Cells that fire together, wire together"

- Hebbův zákon

(Hebb, D. O. (1949) The Organization of Behavior, John Wiley & Sons, Inc., N.Y)

- „When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.“
- Hebbovská synaptická plasticita byla studována často u nižších živočichů, např. Aplysie (E. Kandel)
- Velké neurony, definovaná spojení, apod..

Mechanismy synaptické plasticity

Mechanismů, které vedou k synaptické plasticitě, je mnoho.

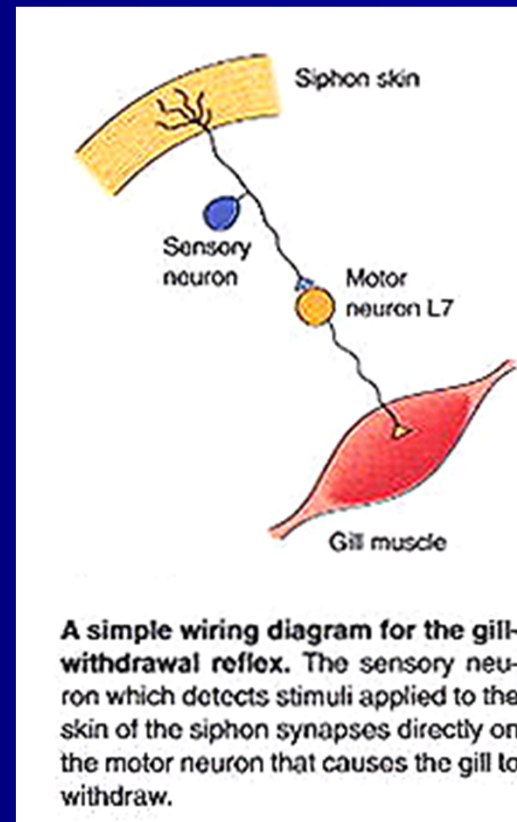
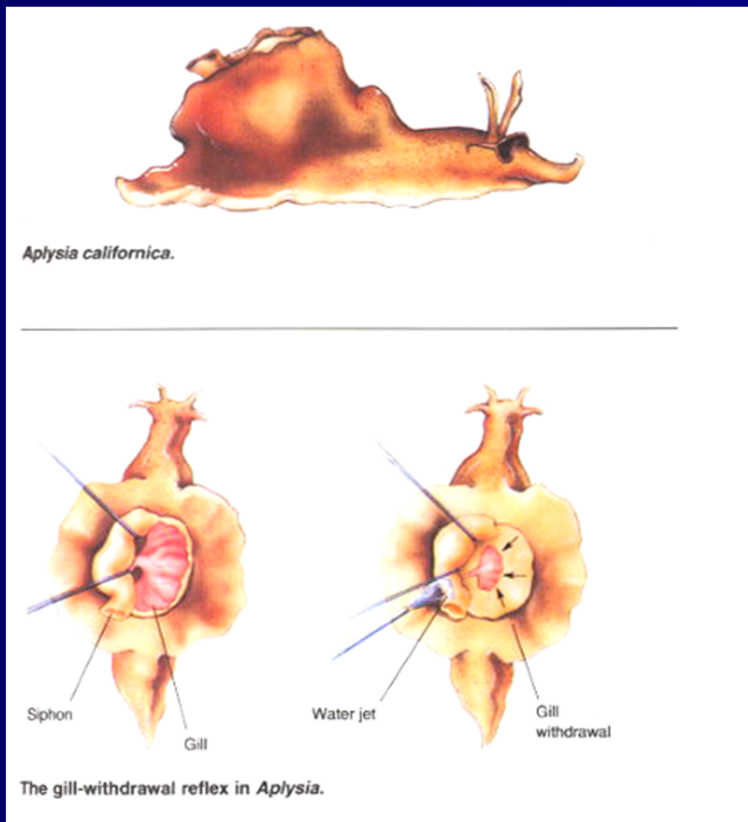
např.

- fosforylace receptorů,
- zvýšení intracelulárního Ca^{2+} ,
- vkládání receptorů do syn. štěrbin,
- syntéza nových bílkovin,
- zvýšení počtu synaptických knoflíků,
- rašení kolaterálních vláken (sprouting)
- zvýšení výlevu z presynaptické terminály prostřednictvím retrográdního signálu

Studium syn.plasticity u jednoduchých organismů - *Aplysia californica*

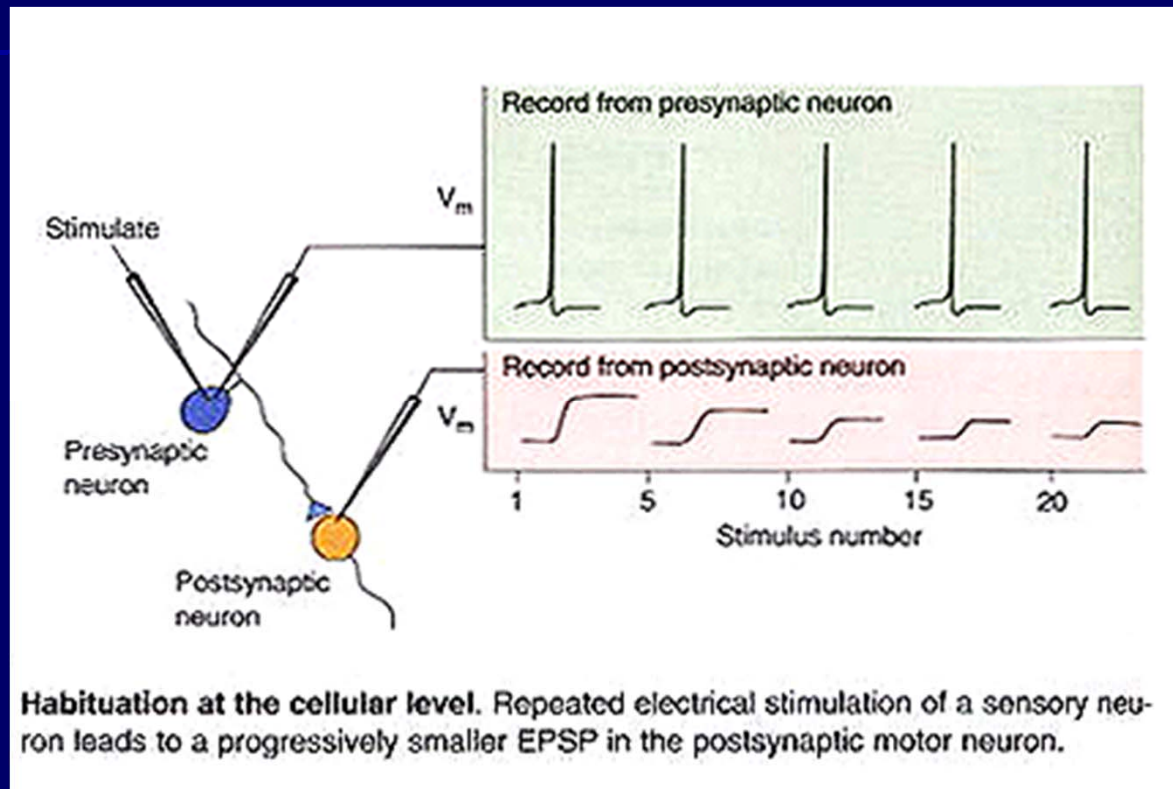
- Několik tisíc snadno identifikovatelných, poměrně velkých neuronů.
- Zpravidla se studuje odpověď žaber (*gill*) na podráždění sifonu (*siphon*), kterým zvíře nasává a filtruje mořskou vodu
- Někdy vědci studují i zatahování sifonu
- Sifon je inervován senzoryčným neuronem (LE mechanosenzorem), který je synapticky spojen s postsynaptickým motorickým neuronem (L7) inervujícím žábry

Mechanisms jednoduchého učení u mořského zeje (*Aplysia*)



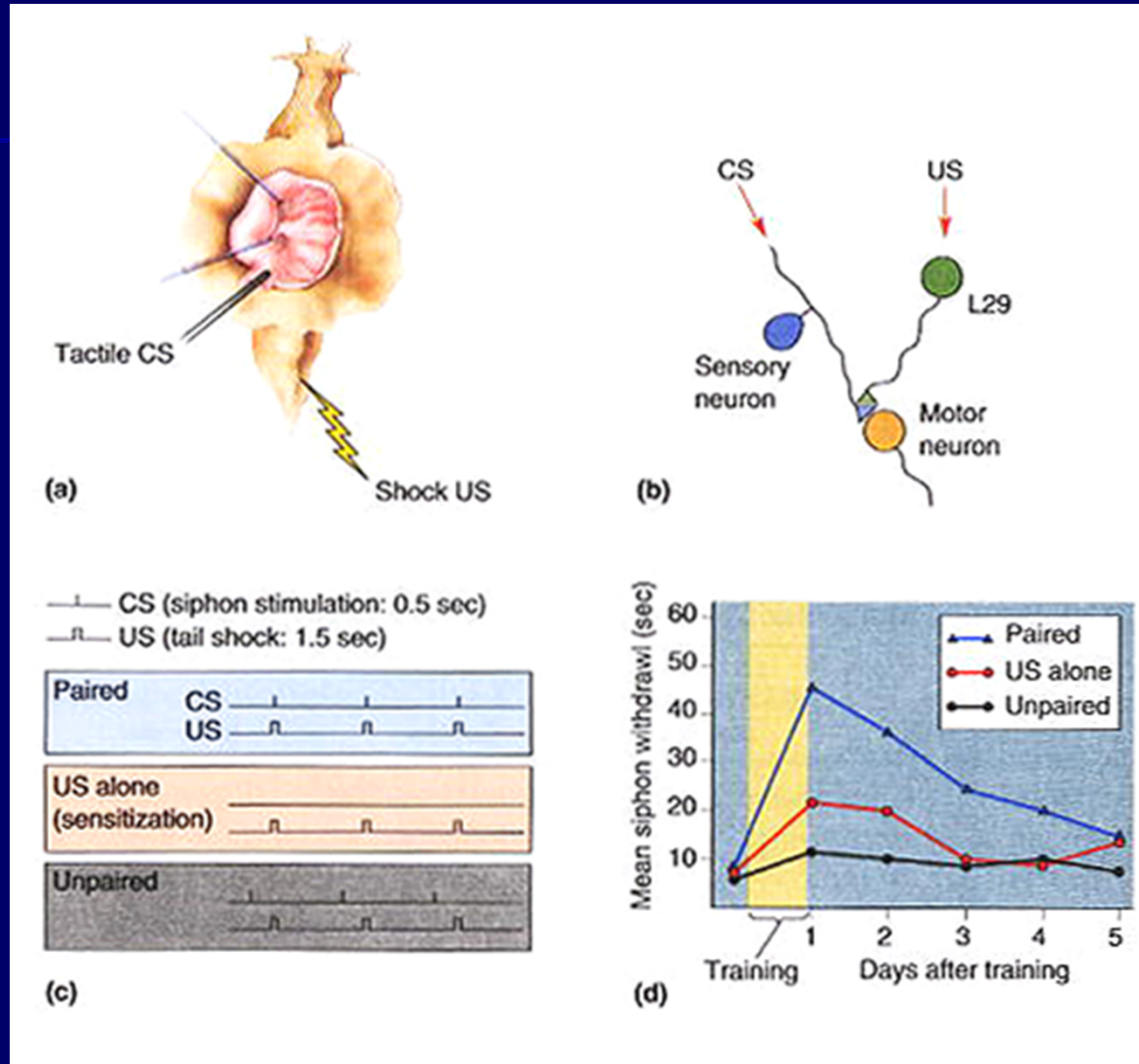
Eric Kandel – Nobelova cena za lékařství a fyziologii (r. 2000)

Habituační zatahovací reflex u Aplysie



Při opakovaném dráždění došlo jak ke snížení behaviorálních odpovědí, tak ke snížení amplitudy postsynaptického potenciálu.

Klasické (pavlovovské) podmiňování zatahovacího reflexu sifonu u Aplysie

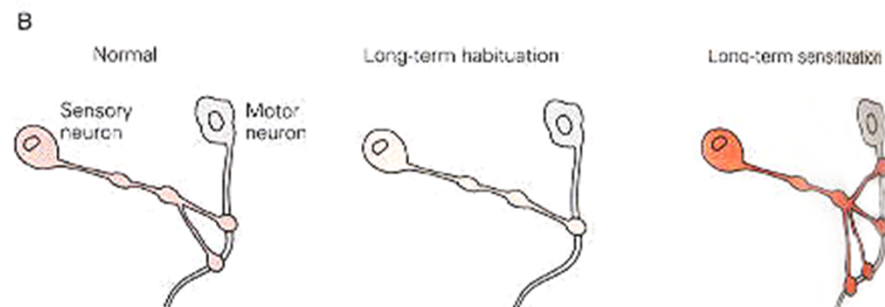
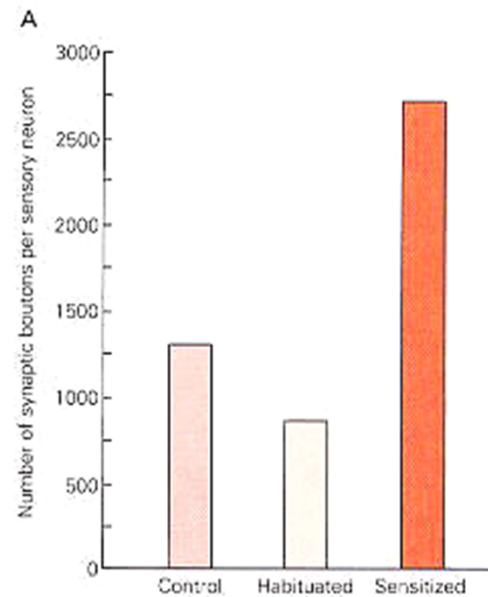


Synaptické změny v důsledku učení u Aplysie

Kandel zjistil, že v důsledku dlouhodobé habituace (opakovanou taktilní stimulací) nebo senzitivace (opakovaným šokováním do ocásku) dochází u zeje ke změně **počtu synaptických spojení** – v důsledku toho i ke změně účinnosti synaptického přenosu

= jeden z příkladů **SYNAPTICKÉ PLASTICITY**

Avšak zvýšení počtu synapsí je pouze jeden z mechanismů...



Operantní podmiňování u Aplysie

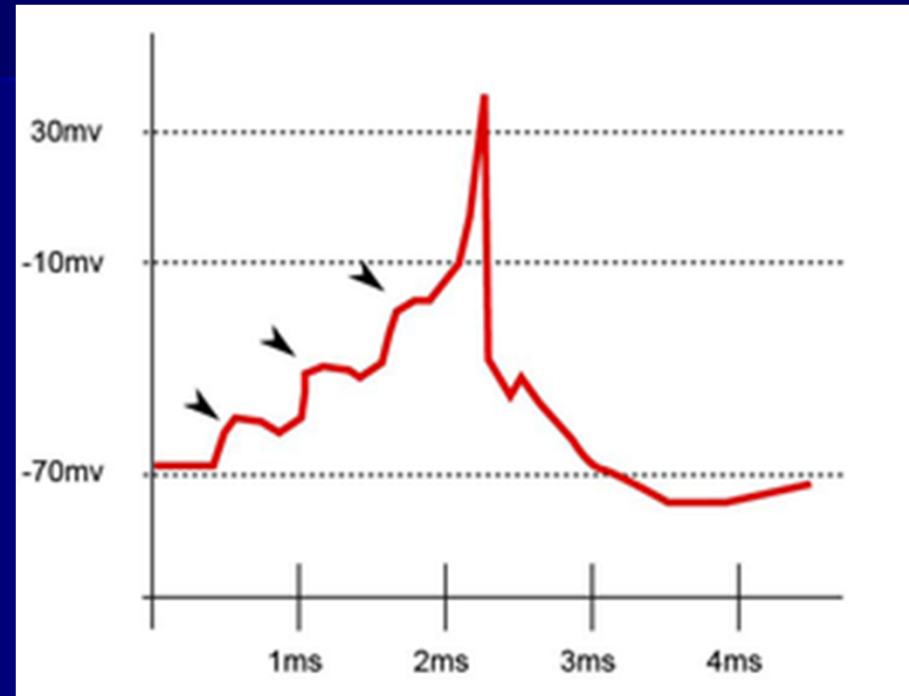
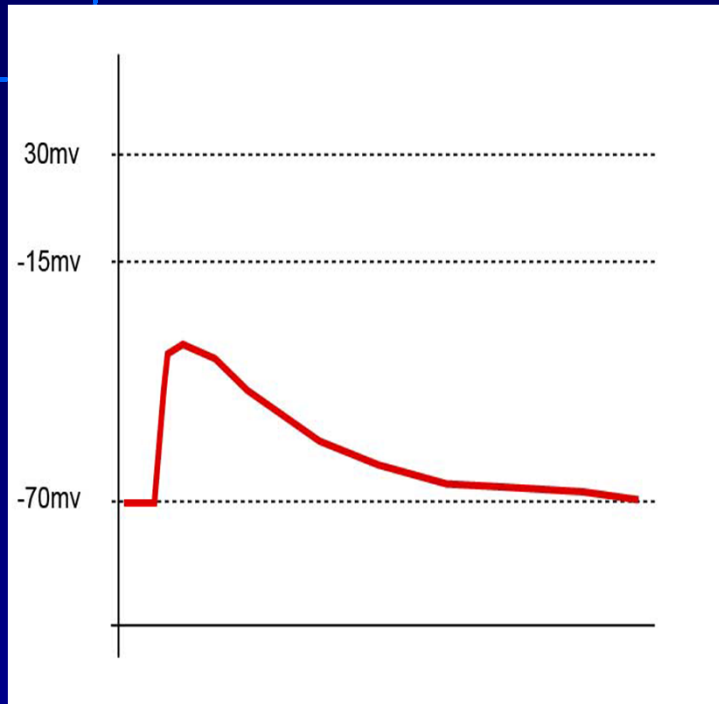
- Hawkins, R.D., Clark, G.A., & Kandel, E.R. (2006). Operant Conditioning of Gill Withdrawal in Aplysia. *The Journal of Neuroscience*, 26, 2443-2448.
- Pokud Aplysie povolila žábry po určitou hranici, byla „potrestána“ mírným šokem do ocásku.
- Zvířata se naučila operantně zatahovat žábry, aby se vyhnula potrestání
- Vzhledem k tomu, že neurony inervující struktury, které se tohoto chování účastní, jsou již identifikovány, mohlo by to otevřít cestu ke studiu mechanismů tohoto typu učení.
 - Michel M, Green CL, Eskin A, Lyons LC. PKG-mediated MAPK signaling is necessary for long-term operant memory in Aplysia. *Learn Mem.* 2011 Jan 18;18(2):108-17.
- *Break*

Nyní přejdeme od bezobratlých k savcům, především laboratorním hlodavcům

- **Synaptická plasticita** je pozorovatelná samozřejmě i u vyšších obratlovců, a dlouho se předpokládalo, že by mohla být podkladem uchování paměťových stop.
- Dlouhodobá potenciace a dlouhodobá deprese - LTP a LTD - horcí kandidáti na neurální substrát učení a paměti



EPSP



EPSP (intracelulárně – u větších vláken, popř. pomocí techniky terčíkového zámku

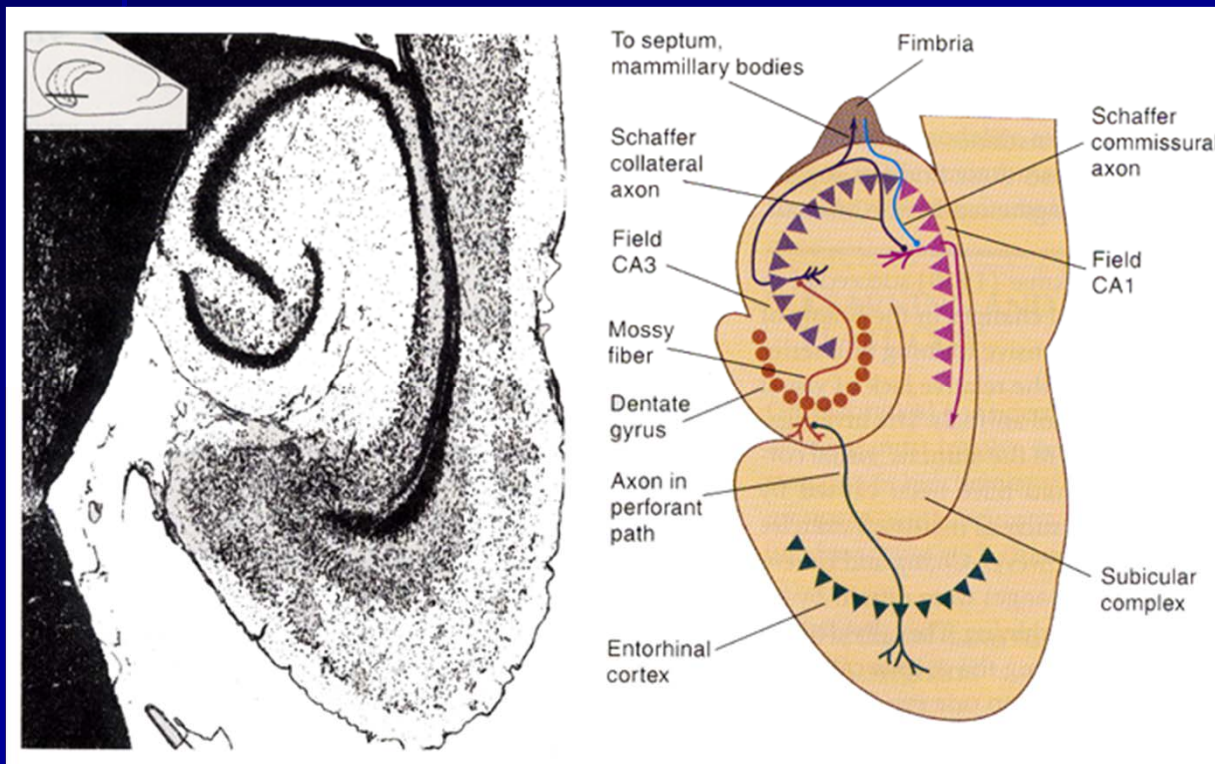
fEPSP (field-EPSP) – extracelulárně, připadá v úvahu u struktur s pravidelným uspořádáním neuronů do vrstev či lamin – např. hipokampus

LTP a LTP

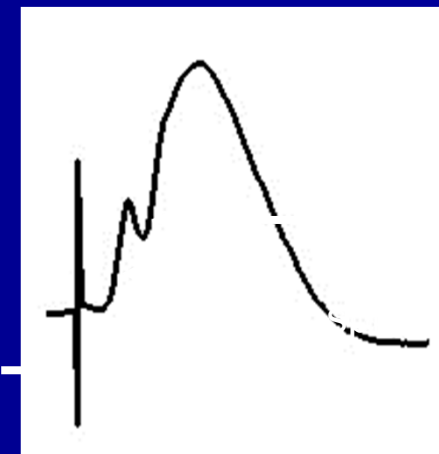
- Dlouhodobé zvýšení, resp. snížení odpovědí, neboli amplitudy EPSP pro předchozí tetanické stimulaci
- Má dvě fáze: časnou (E-LTP) a pozdní (L-LTP)
- Časná fáze je nezávislá na proteosyntéze, pozdní na ní závisí

Dlouhodobá potenciace - LTP

Dlouhodobé zvýšení synaptických odpovědí post synaptického neuronu (=amplitudy EPSP) po tetanickém dráždění presynaptické terminály



Stimulus artefact



A population field potential ("EPSP") evoked in the dentate gyrus by stimulating the perforant path.

Velmi často se měří v hipokampu a přilehlých strukturách.

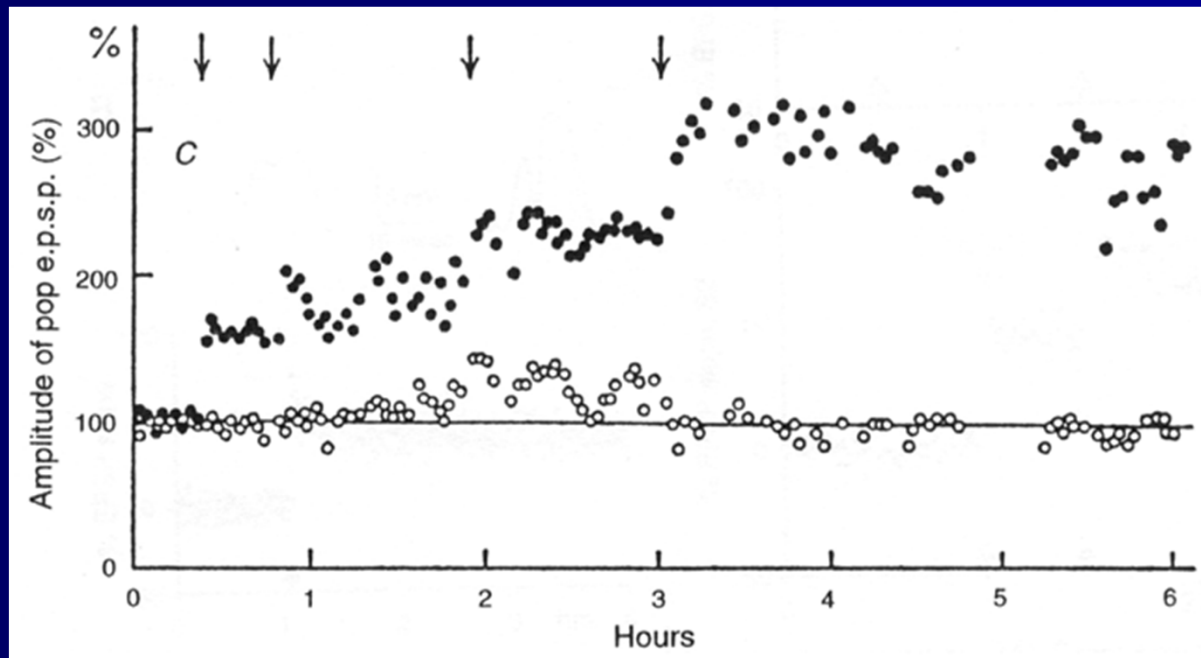
Dlouhodobá potenciace (LTP)



Tim Bliss

Terje Lomo

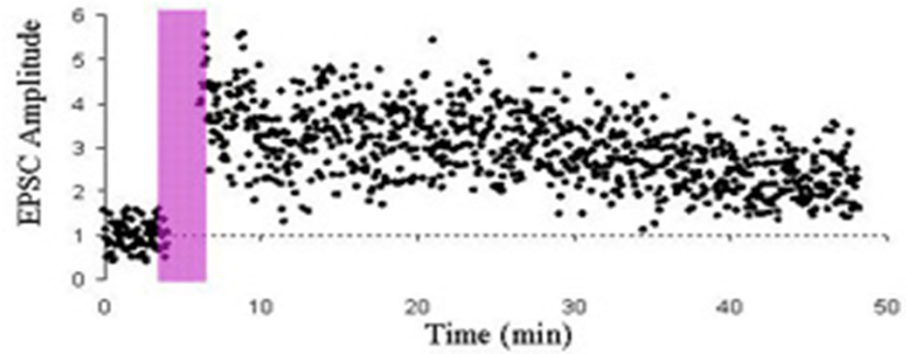
Dlouhodobé zvýšení synaptických odpovědí post synaptického neuronu (=amplitudy EPSP) po tetanickém dráždění presynaptické terminály
Někdy se vykládá jako zesílení komunikace mezi presynaptickým a postsynaptickým neuronem, na základě aktivace obou těchto neuronů



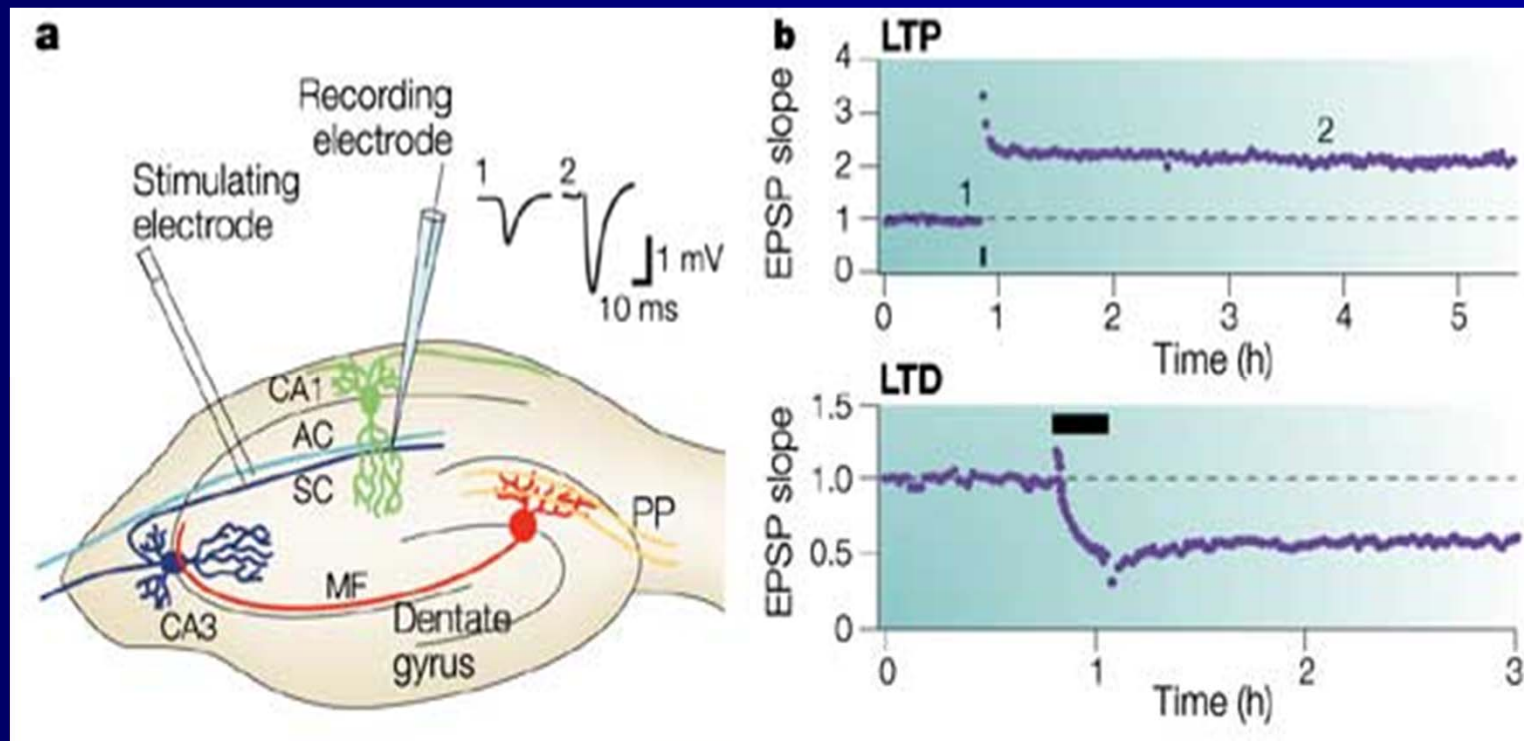
Bliss and Lomo (1973) *J. Physiol.* 232: 331-356
- LTP poprvé popsána v gyrus dentatus králíka

LTP

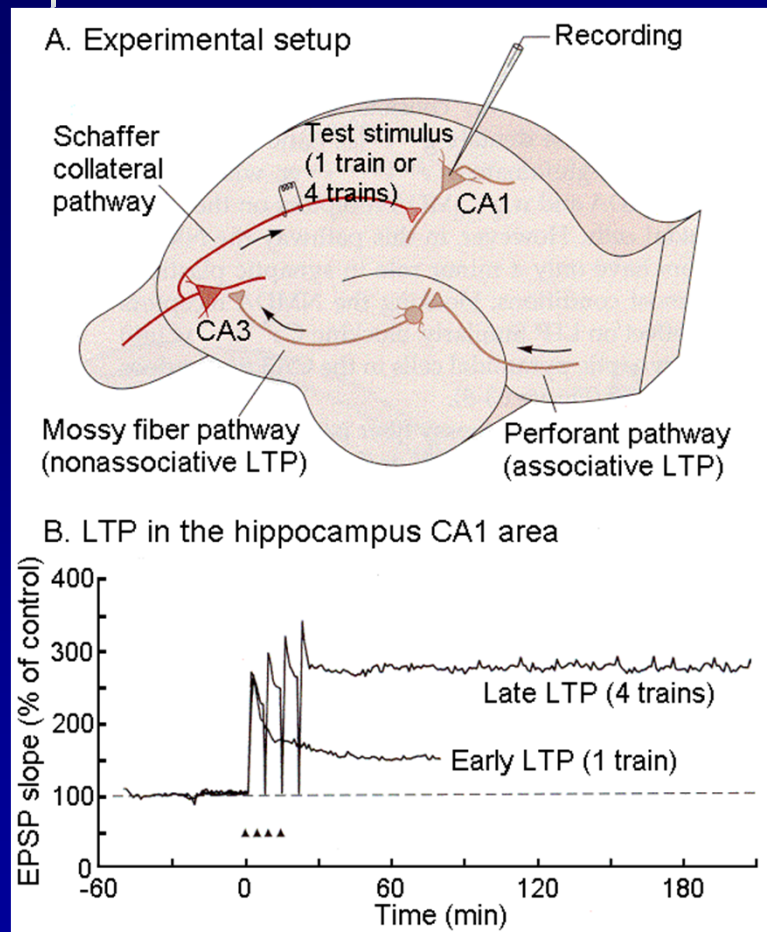
Long Term Potentiation, a mechanisms for memory formation



Dlouhodobá potenciace (LTP) vs. Dlouhodobá deprese (LTD)



Časná a pozdní fáze LTP (early LTP, late LTP)



- **Časná fáze - nezávislá na proteosyntéze**
 - Induction phase
 - Maintenance phase
- **Pozdní fáze - závisí na syntéze nových bílkovin a remodelaci synapse.**
 - Induction
 - Maintenance

Časná a pozdní fáze LTP - mechanismy

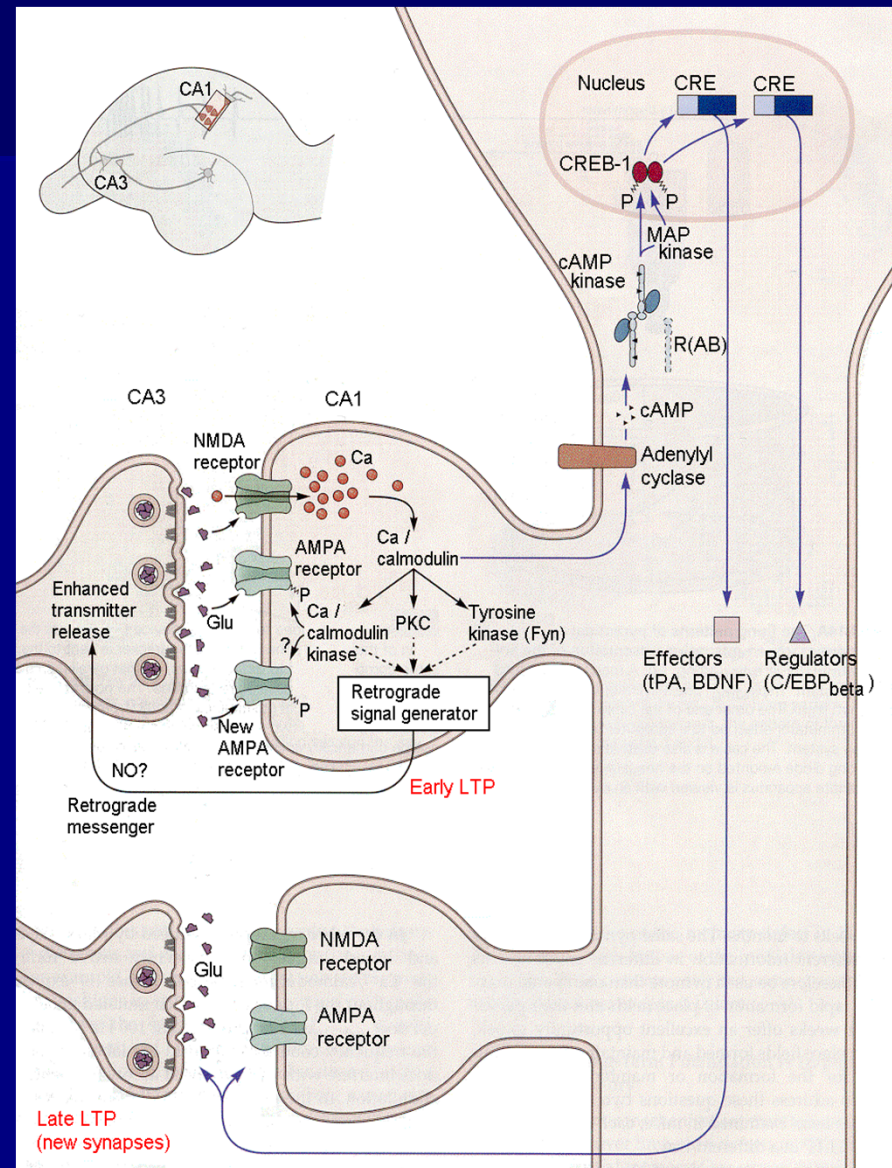
• **Iniciace časně fáze - zvýšená aktivace AMPA receptorů - depolarizace - odblokování NMDA receptorů - vtok Ca^{2+} - Ca-calmodulin kináza II - PKC - MAPkináza (MAPK)**

• **Udržování časně - CMKII a PKC ztrácí závislost na Ca - perzistentní aktivita > fosforylace AMPA receptorů, inserce rezervních AMPA receptorů (bez proteosyntézy)**

• **Indukce pozdní - MAPK (ERK) vykazuje prezistentní aktivitu**

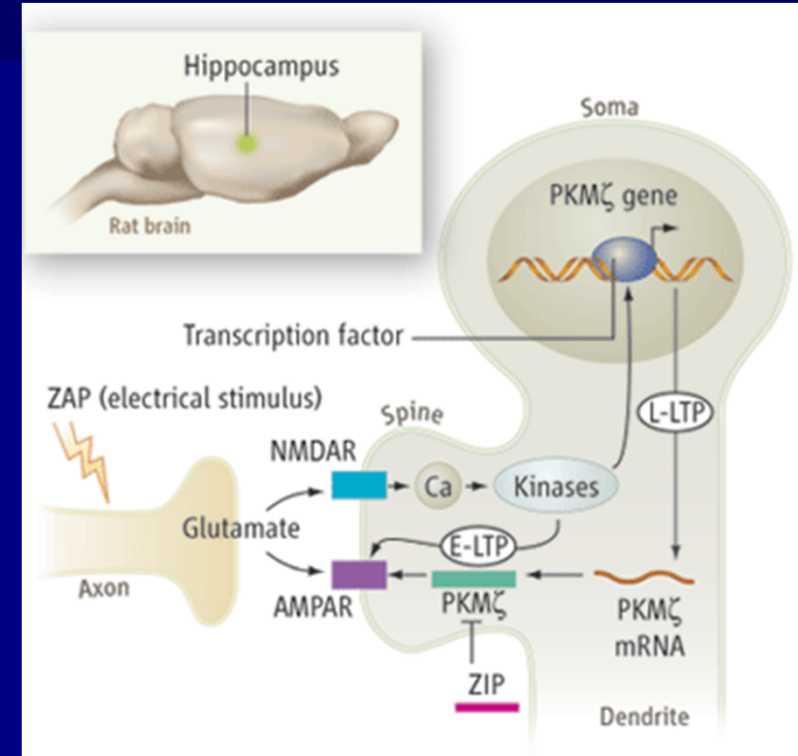
• **Udržování pozdní - ERK fosforyluje řady cytosolických a jaderných molekul, které nakonec vedou k syntéze specifických proteinů, které udržují late-LTP, především PKM ζ**

J Neurochem. 2001 Jan;76(1):1-10. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. Sweatt JD.



Udržovací fáze pozdní LTP - *hot spot* současné neurochemie paměti

- Během udržovací fáze dochází přes kinázy a transkripční faktory k syntéze PKM ζ (zeta), což je podtyp PKC, která je po své syntéze konstitutivně aktivní a reguluje *trafficking* a syntézu AMPA receptorů, reorganizaci synaptických proteinů a remodelaci synapse.
- Patrně i jiné kinázy, ale nedávná studie ukázala, že syntéza PKM ζ udržuje specificky pozdní LTP.
- Z výše uvedeného vyplývá, že v indukci a udržování časně LTP a v indukci pozdní LTP hraje roli mnoho regulačních kináz, ale na PKM ζ se patrně signál sbíhá



Retrográdní signalizace

- Nicméně, během pozdní LTP dochází také ke komunikaci s presynaptickým zakončením, neboť bylo prokázáno, že se zvyšuje zásoba synaptických váčků v terminále a dochází k dalším změnám na presynaptických proteinech, měla by tedy existovat retrográdní signalizace (uvažuje se o NO, nebo proteinech extracelulární matrix – viz biologie buňky)

Je tedy skutečně LTP neuronálním substrátem paměťové stopy u savců?

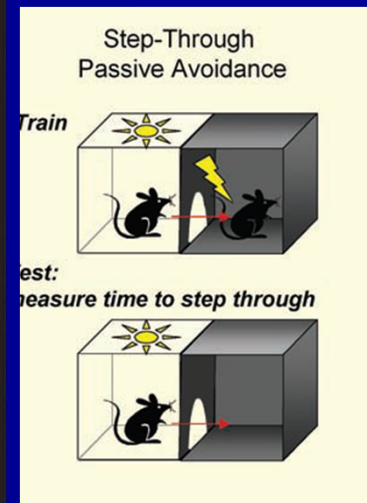
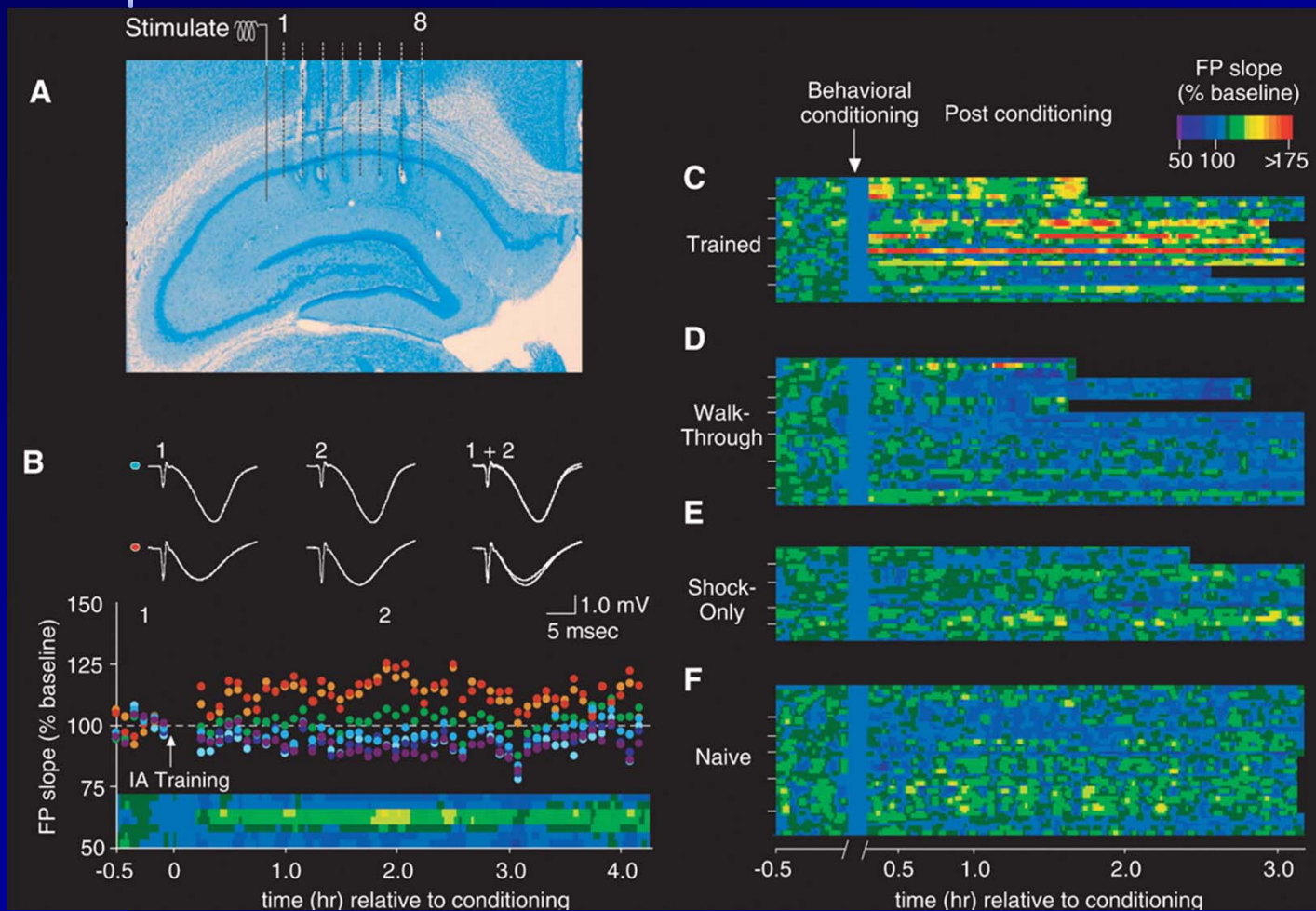
■ Jak se to dá prokázat?

Např.

- Prokážeme, že v důsledku učení dochází k indukci LTP
- Zablokování specifické molekuly klíčové pro pozdní LTP (např. PKM ζ) by mělo vymazat paměťovou stopu.

Učení přímo indukuje LTP

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

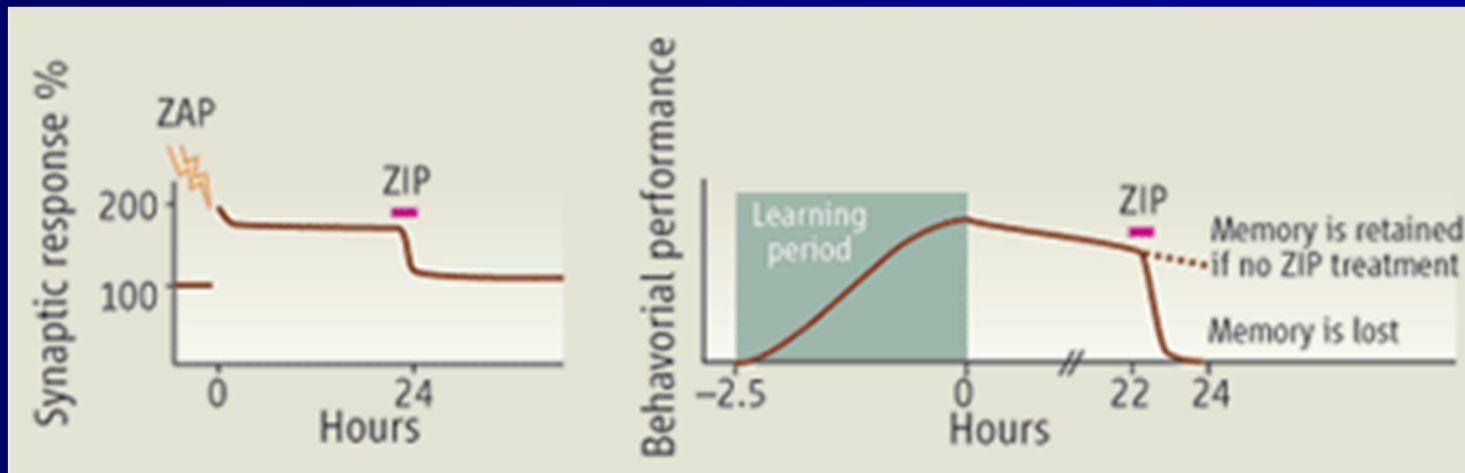


Učení přímo indukuje LTP II

- Whitlock a spol. ukázali, že trénink potkanů v úloze pasivního vyhýbání (o té si povíme v kapitole u paměťových úlohách) způsobuje u některých neuronů indukci LTP.
- U mnoha z měřených neuronů však LTP indukována není, a to bylo patrně důvodem, proč se na objev čekalo tak dlouho.
- Je to rovněž podpůrným důkazem pro „*distributed memory encoding*“ - viz obecný modul

Inhibice PKM ζ vede k vymazání již ustavené paměťové stopy

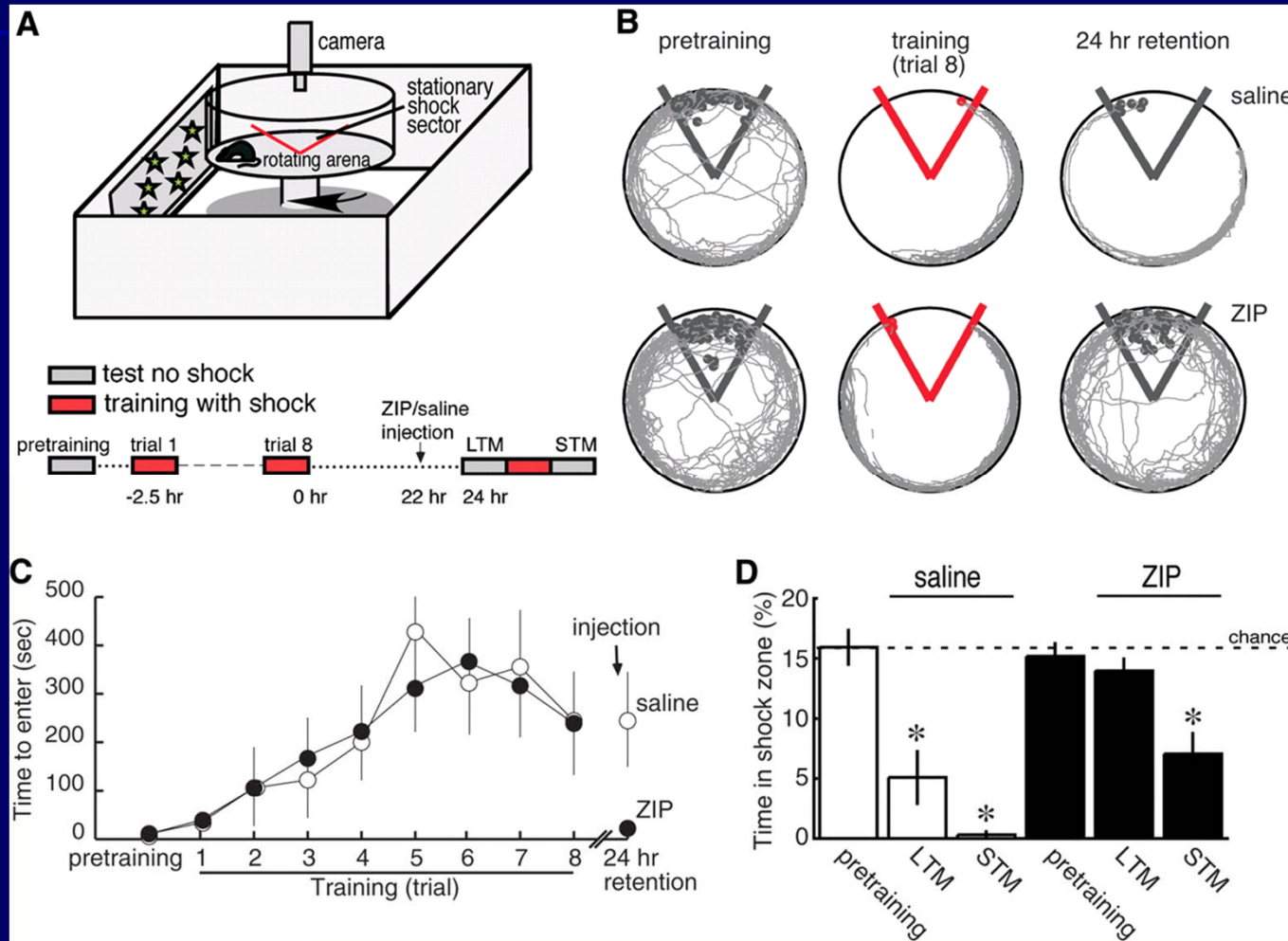
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. **Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP.** Science. 2006;313(5790):1141-4



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 pro udržovací fázi pozdní LTP

ZIP, inhibitor proteinkinázy $M\zeta$, maže paměťovou stopu, ale nebrání novému učení.



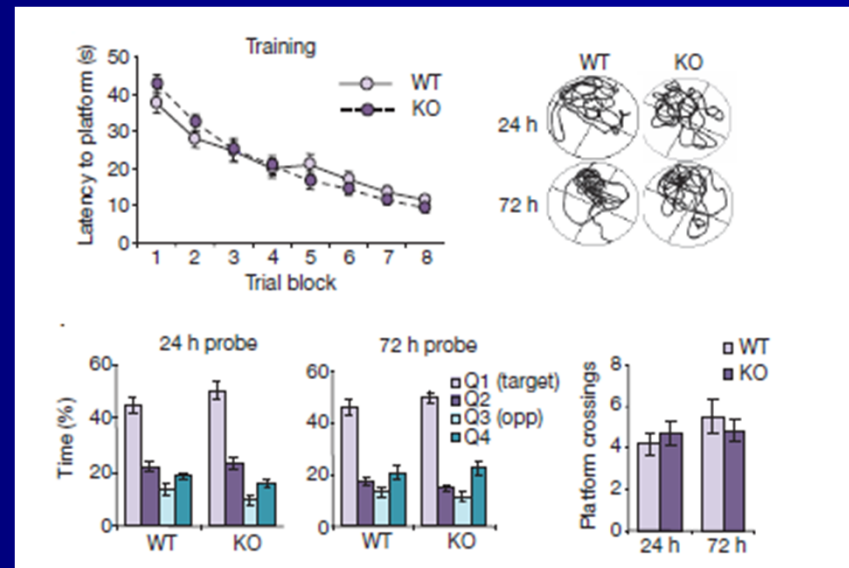
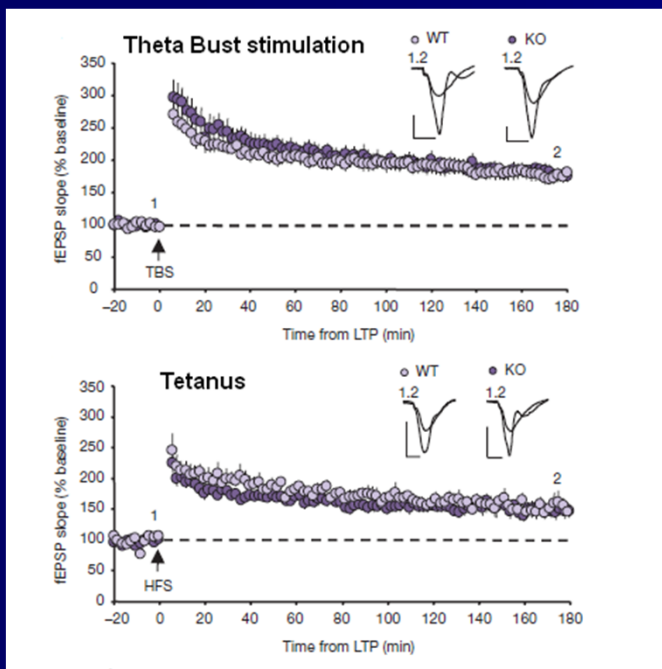
Problematické otázky

- 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 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
 - Nedávno bylo také prokázáno, že u řady typů paměti tento mechanismus funguje
 - 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.

Nejnovější negativní důkaz o PKMzeta a LTP

- Letos vyšla práce popisující transgenní potkany s **konstitutivní a podmíněnou delecí PKM ζ** a u nich **nebylo pozorováno žádné zhoršení paměti ani LTP**.
- Naopak aplikace ZIP těmto potkanům vedla k vymazání LTP, zdá se že ZIP tedy blokuje doposud neznámé procesy, kromě aktivity na PKM ζ

Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Hugarir RL. PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. Nature. 2013;493(7432):420-3



Shrnutí

- Na paměť je možné a užitečné nahlížet jako na změny v chování vyvolané předchozí zkušeností subjektu
- Takovéto změny v chování dané zkušeností je možné pozorovat i u evolučně „primitivních“ organismů
- Tyto změny chování jsou způsobeny změnami v činnosti CNS, především změnou v síle synapsí v mozku
- Dlouhodobá potenciace (LTP) jako příklad synaptické plasticity by mohla neuronálním podkladem alespoň některých typů paměti, její zablokování tuto paměť vyruší, ale PKMzeta nemusí být onou „memory molecule“
- Stále zůstává mnoho nevyjasněných otázek