

Pokročilé techniky ve studiu učení a paměti

Neurobiologie kognice a paměti

Aleš Stuchlík a Štěpán Kubík

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

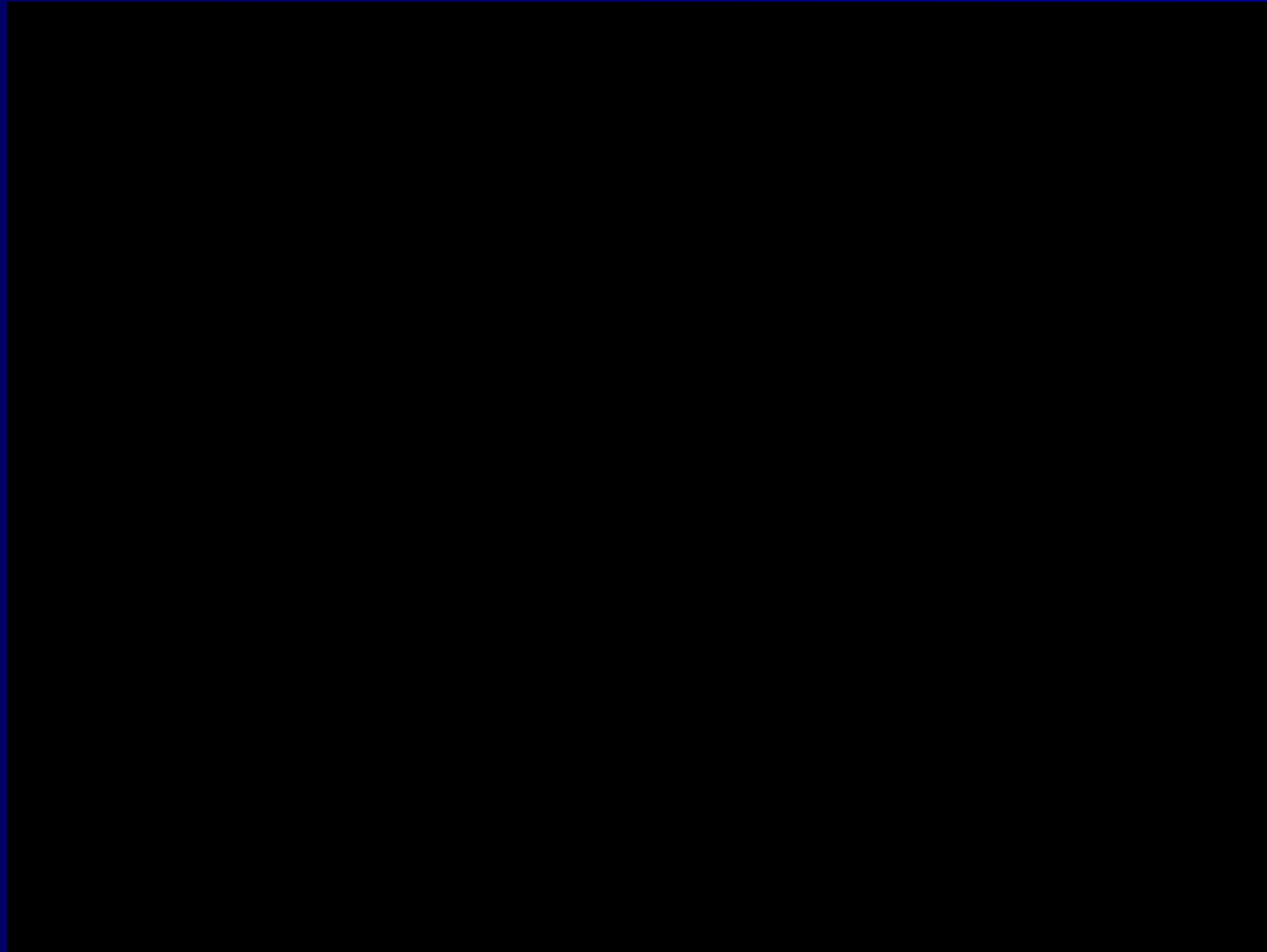
Pokročilé metody studia učení a paměti

- *Behaviorální techniky – viz výše*
- **Elektrofyzilogie** – in vitro
 - In vitro
 - In vivo
 - **Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat**
- Intervenční techniky
- IEG Imaging
- Funkční zobrazování - fMRI, PET
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

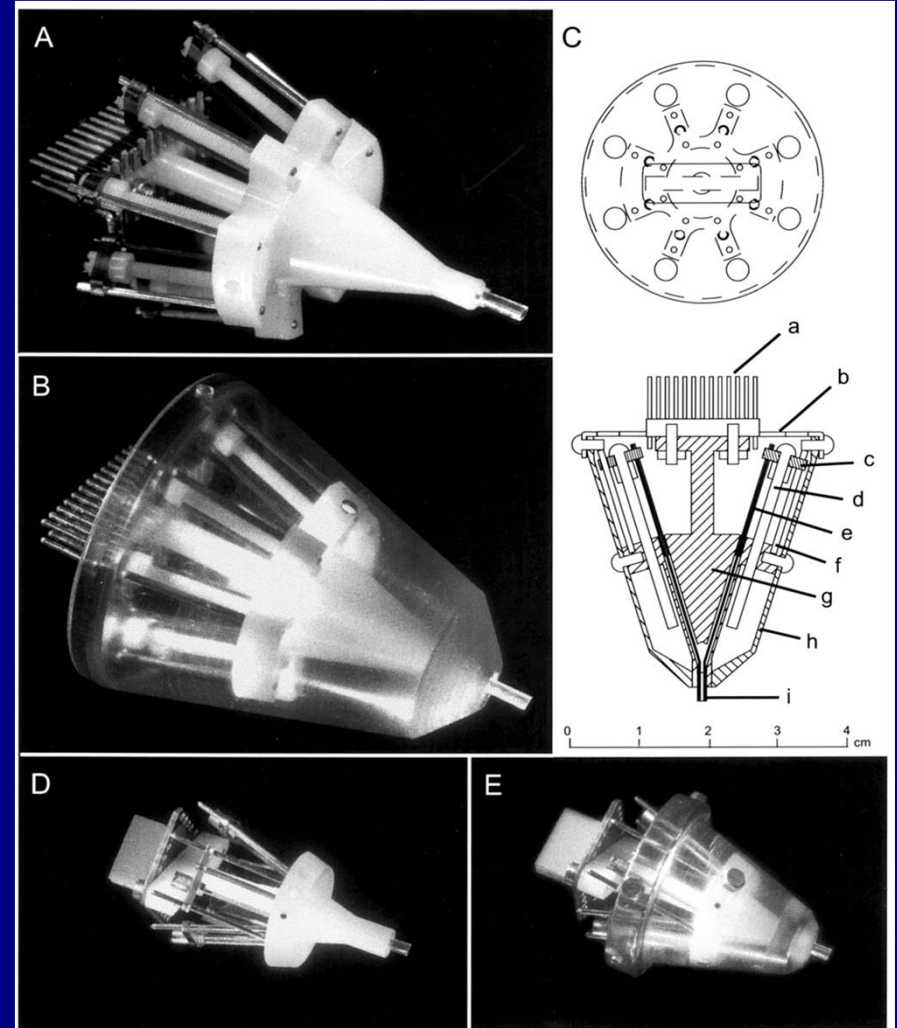
Eletrofyzologie

- Multiple single unit recording
 - Hippocampal place cells
 - 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

Place cells



Headstages - microdrives



Tetrodes & microdrives

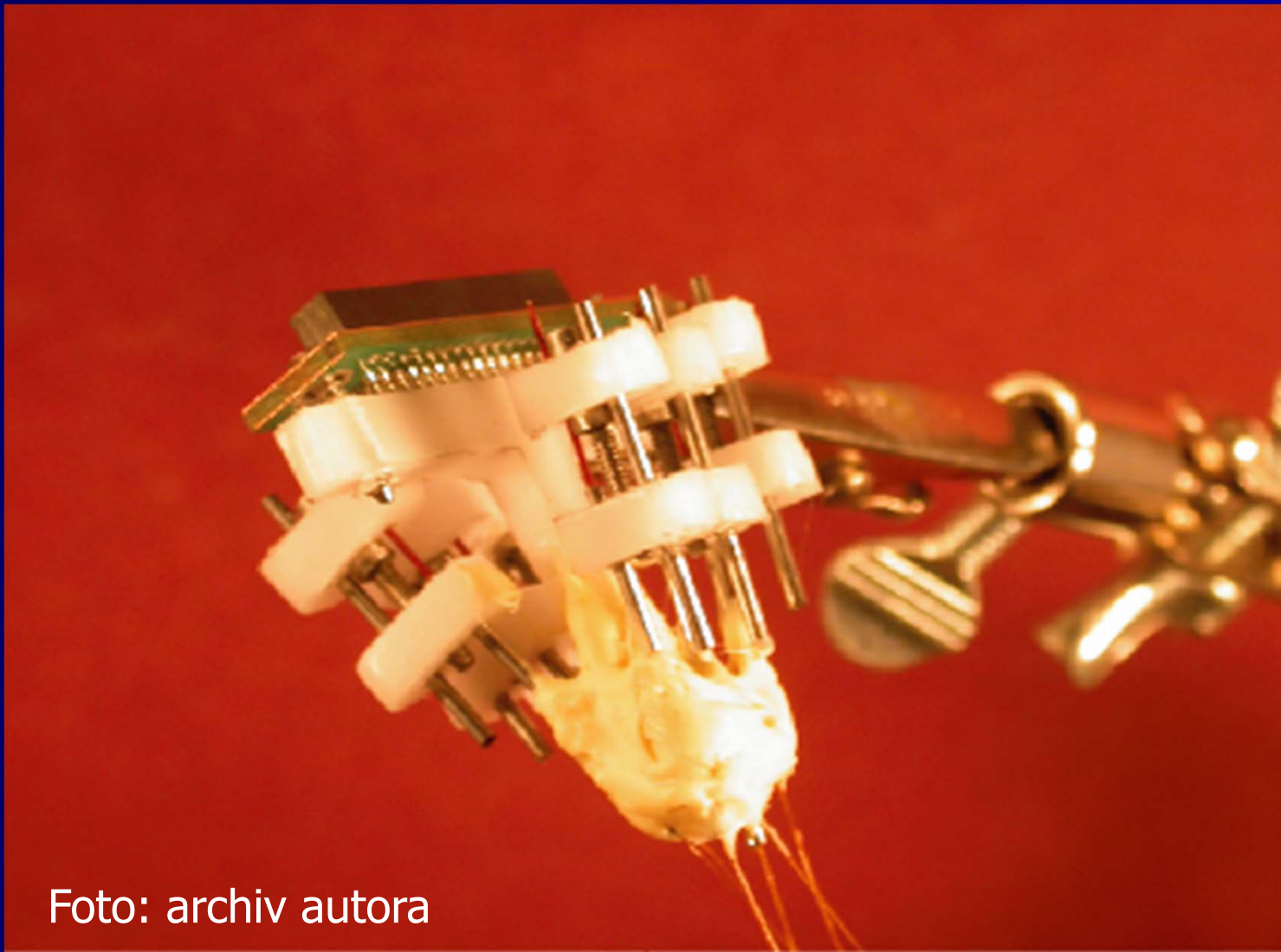


Foto: archiv autora

Tetrodes & microdrives

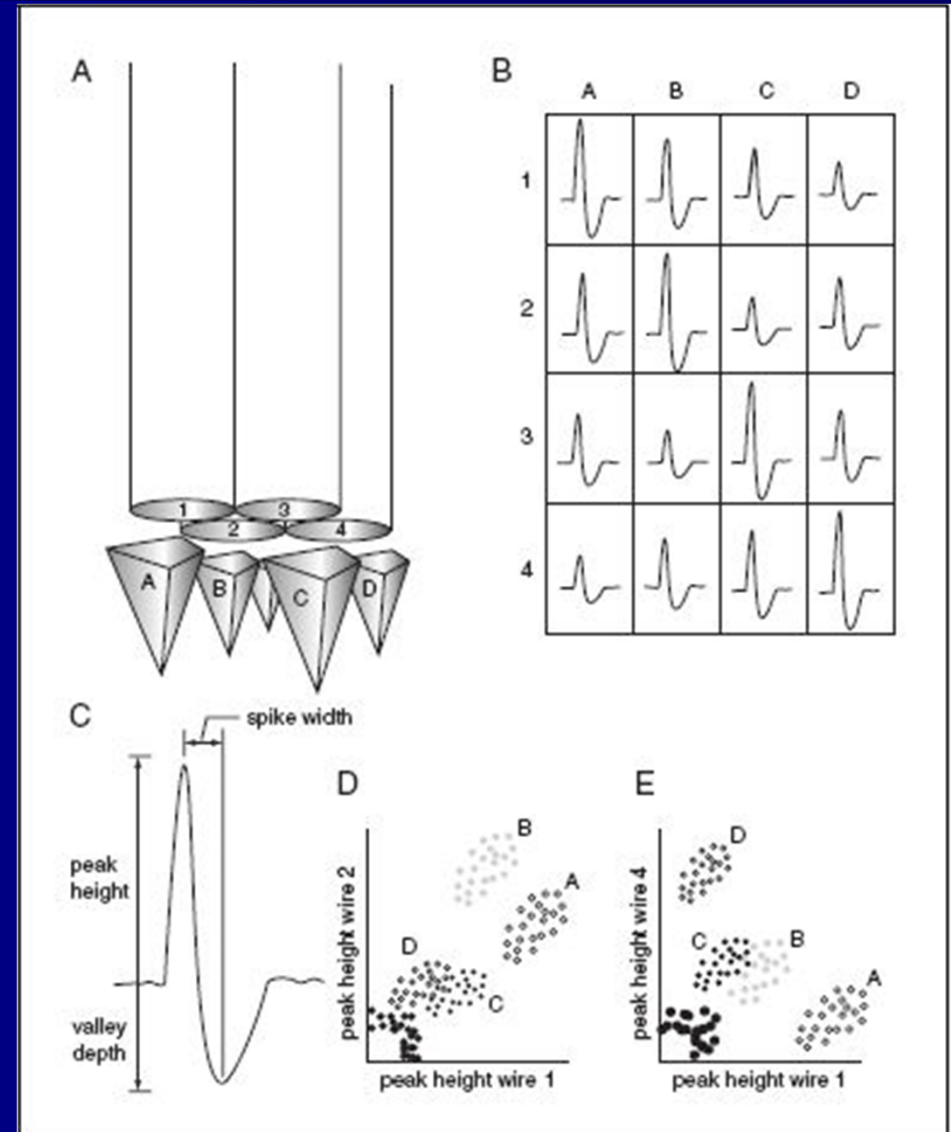


Foto: archiv autora

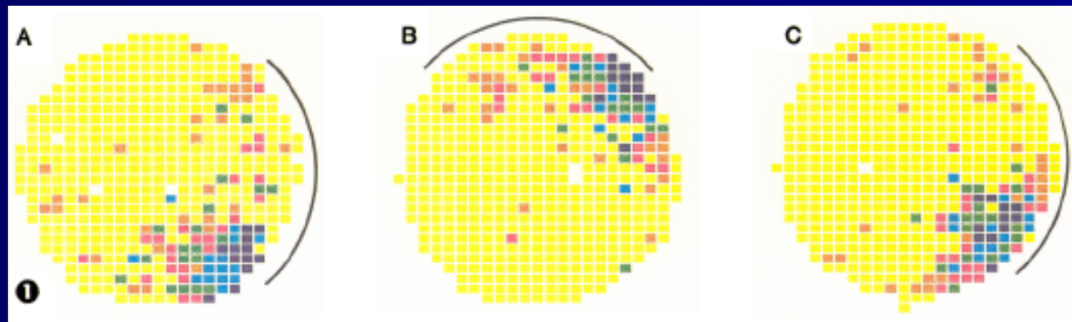
Multiunit recording

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

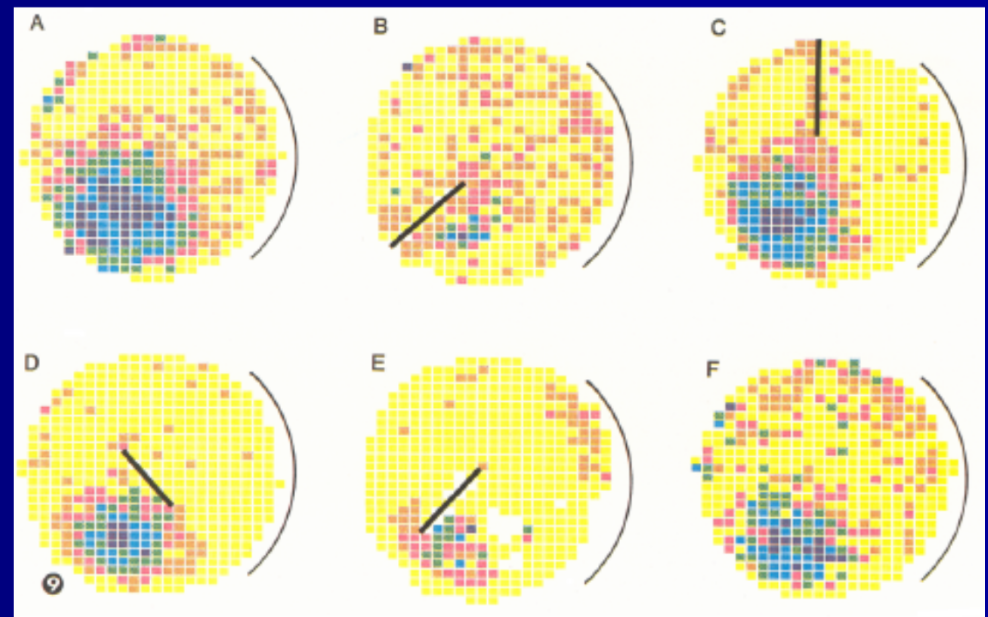
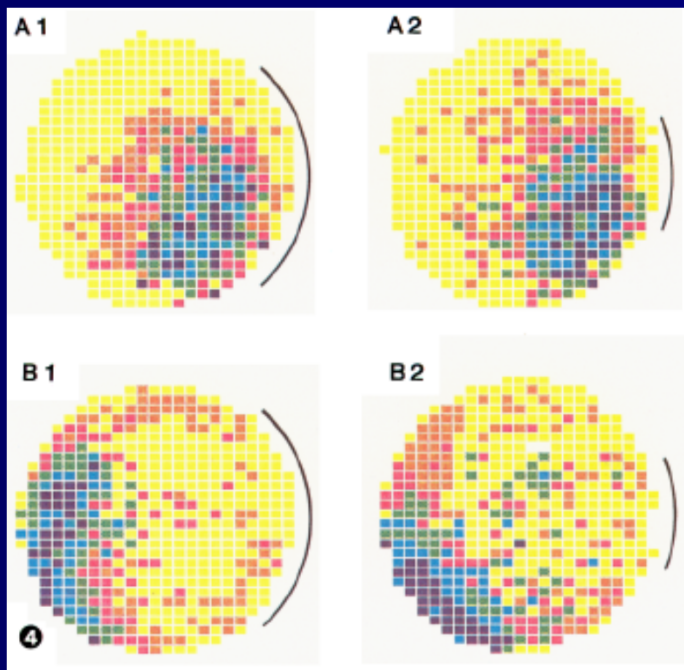
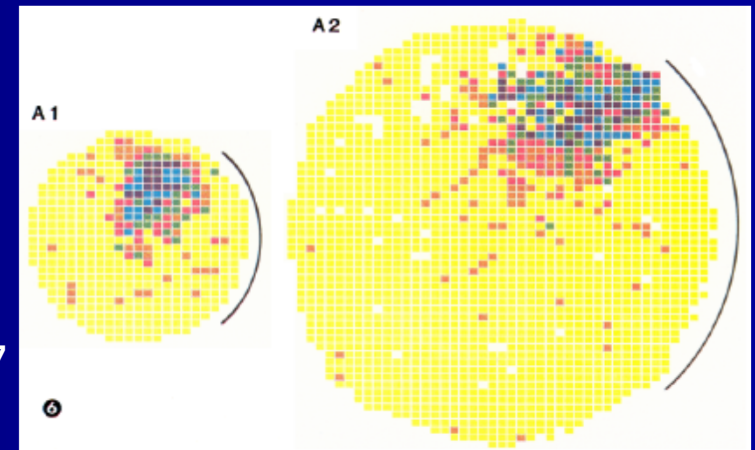
Szymusiak & Nitz, Curr Prot Neurosci
6.16, 2002



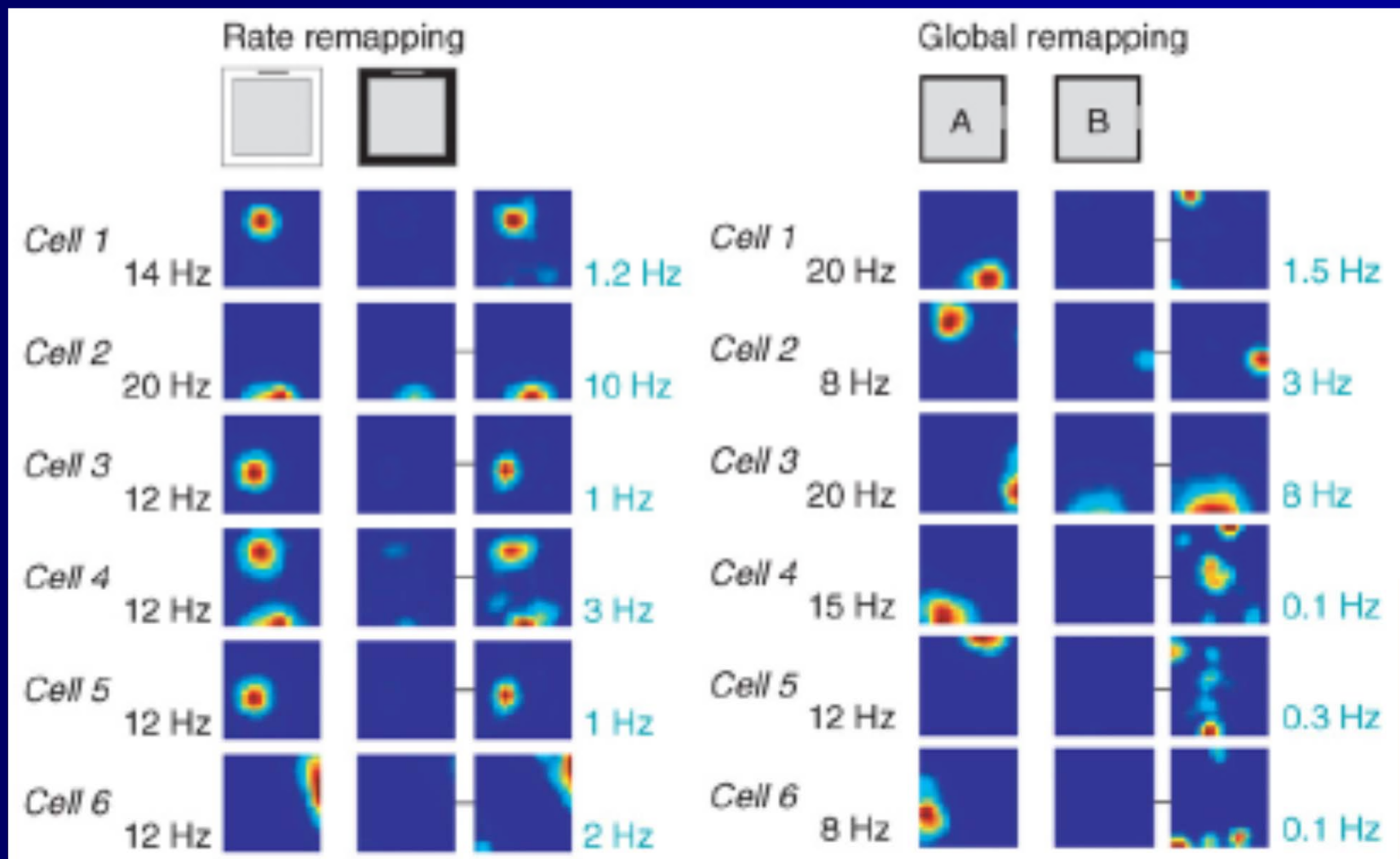
Firing rate maps a změny v prostředí



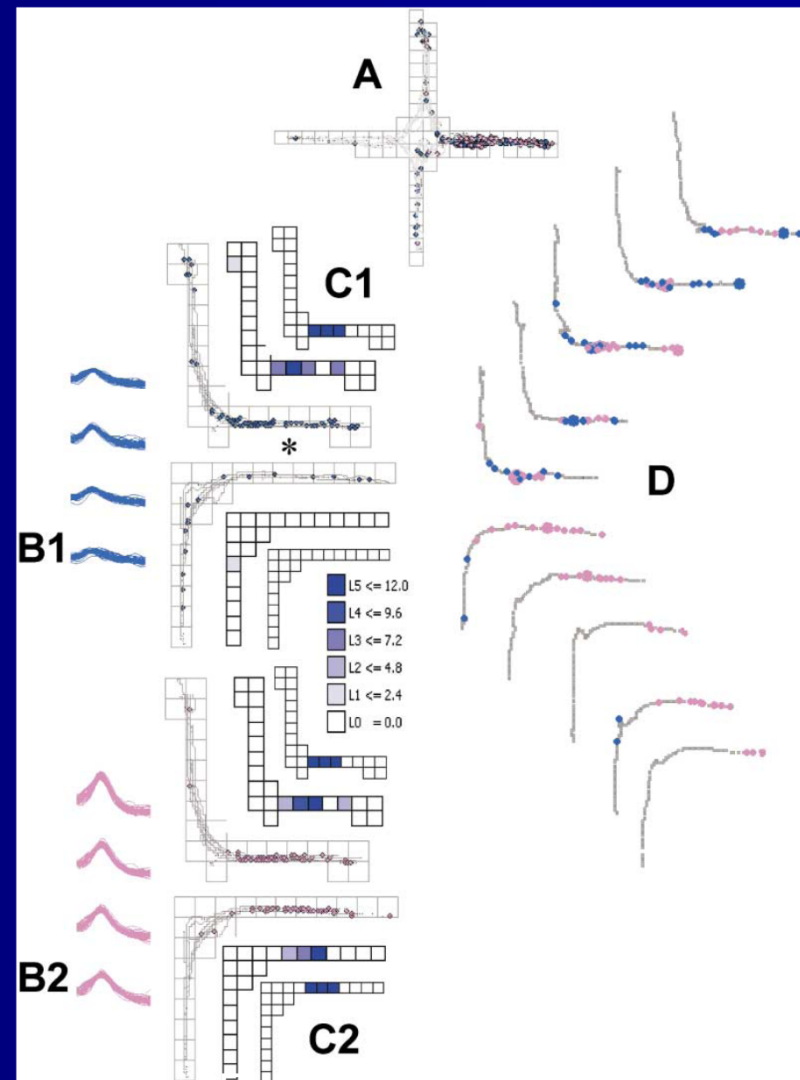
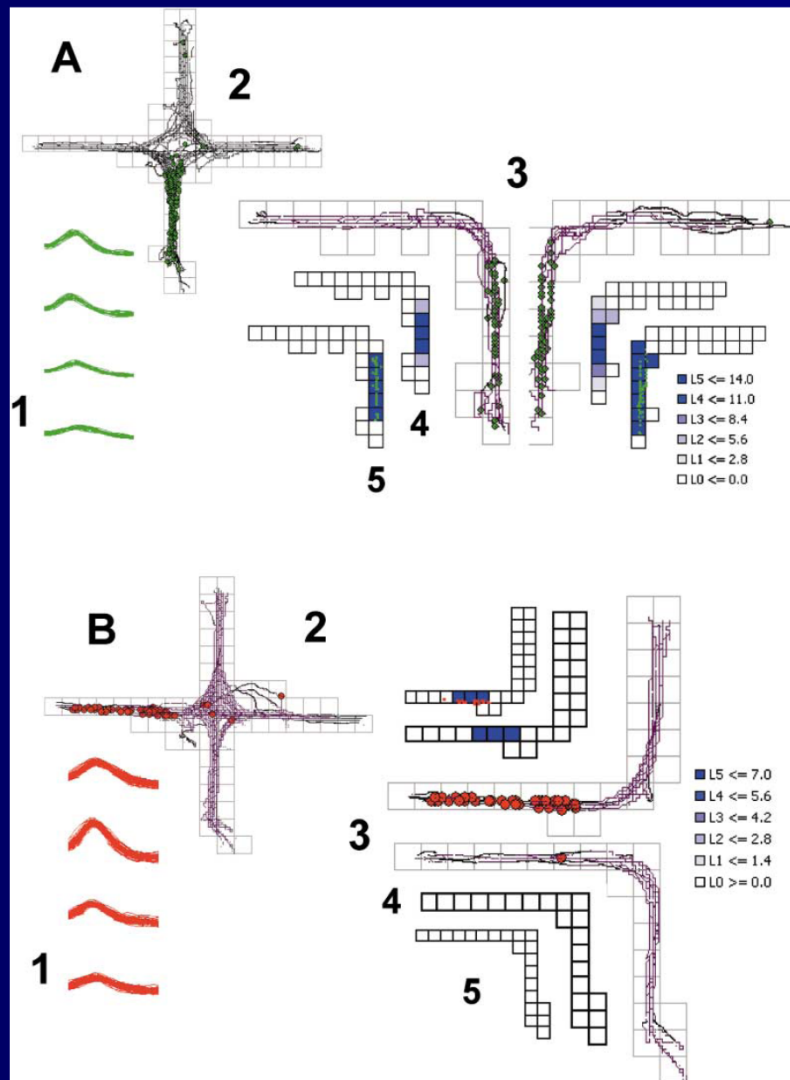
Muller & Kubie, 1987



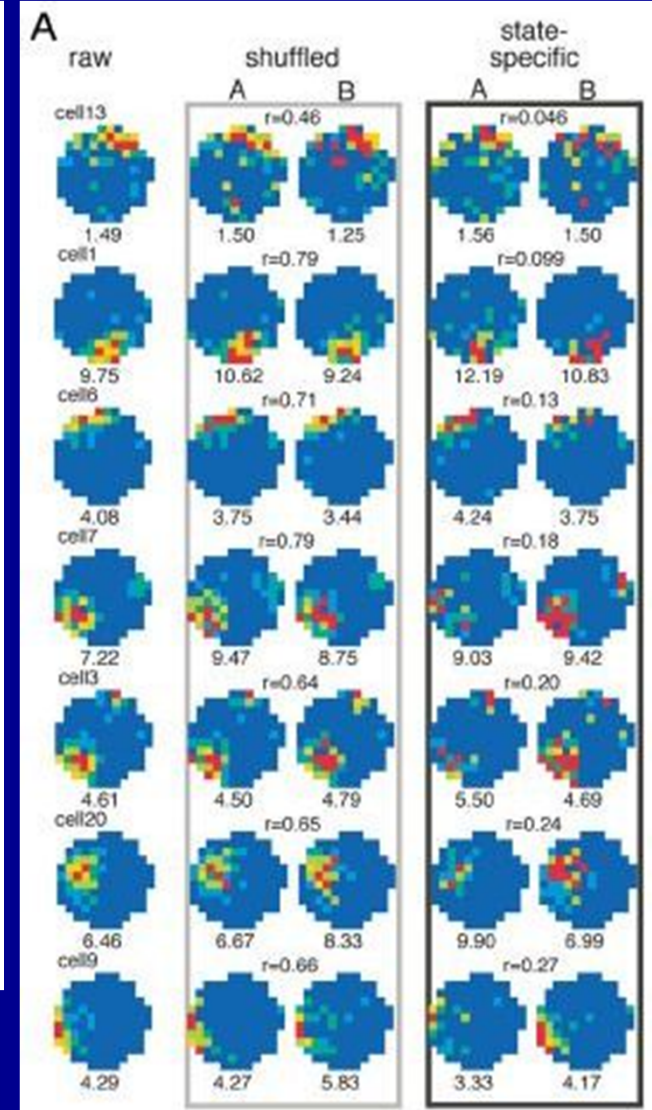
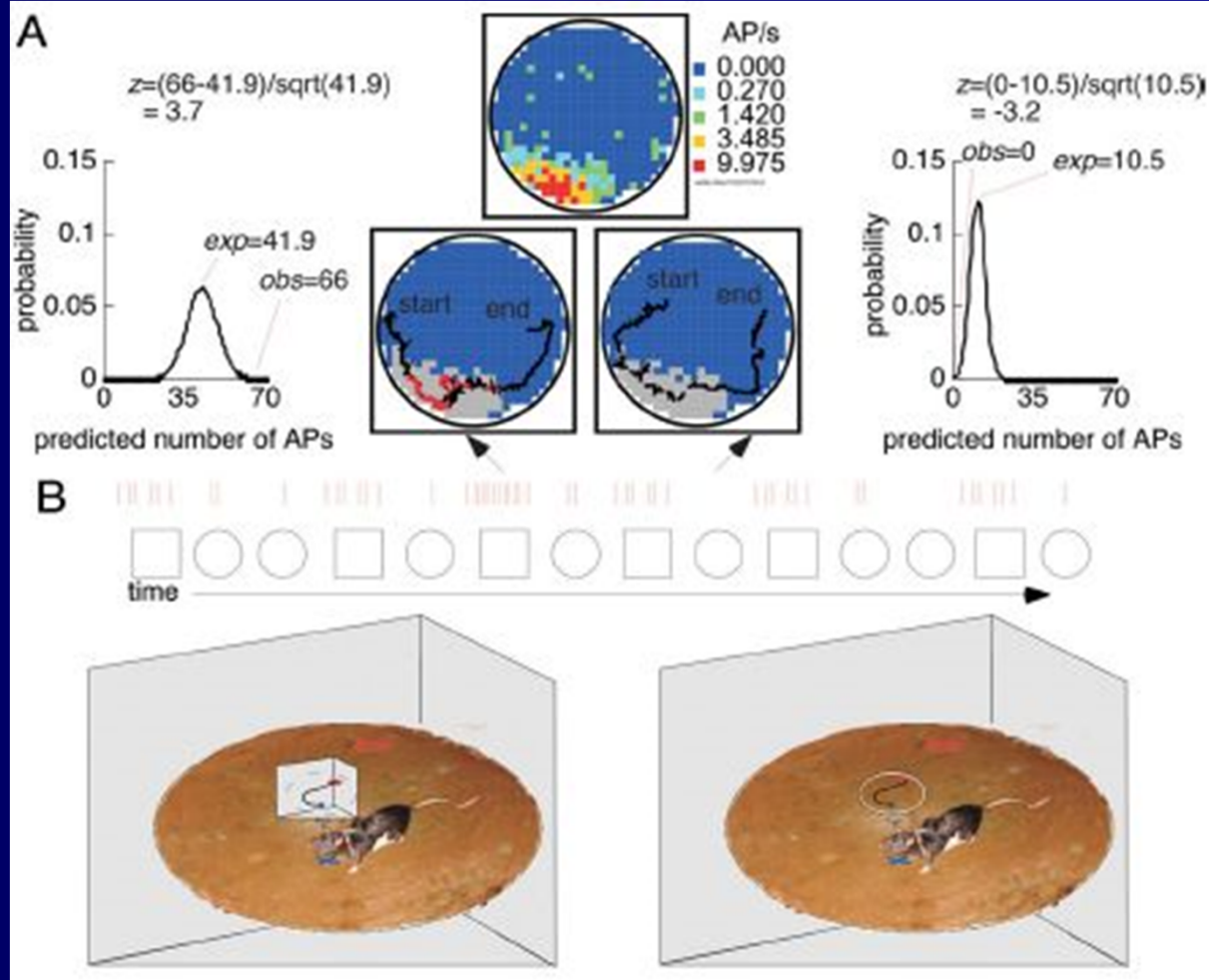
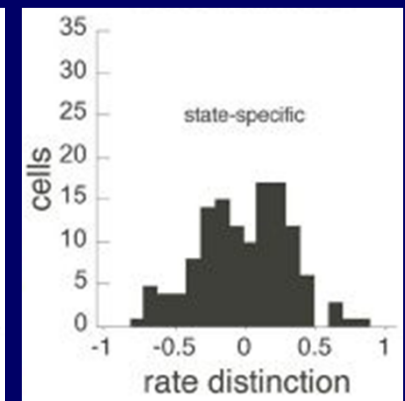
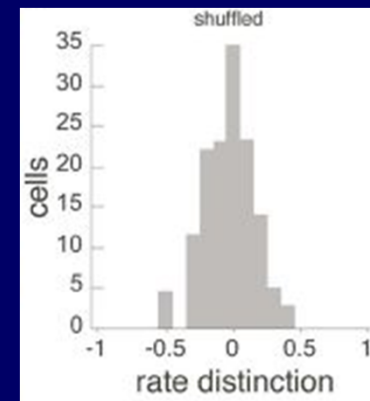
Remapping



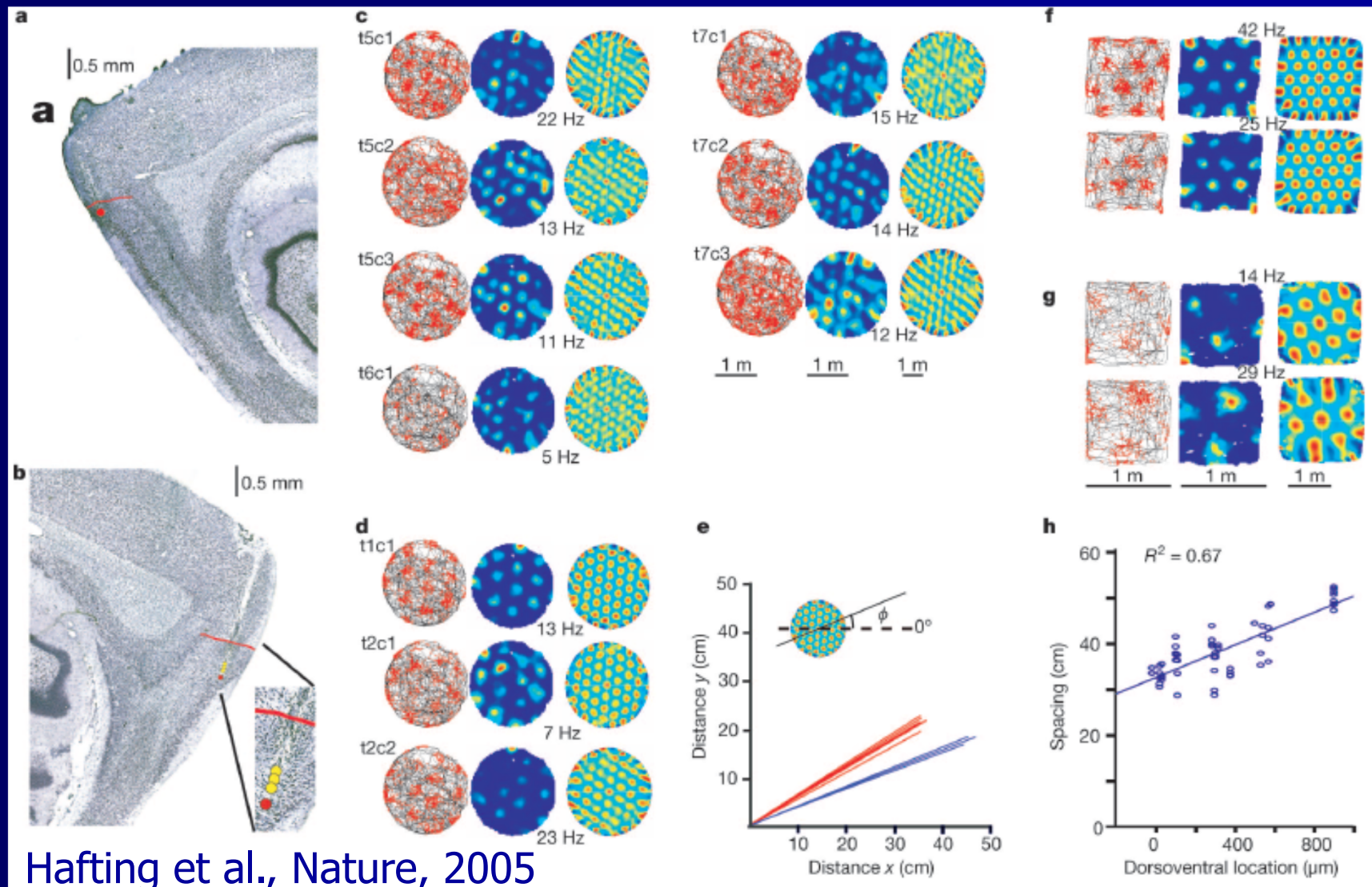
Prospective and retrospective coding



Overdispersion



Entorhinal grid cells



Hafting et al., Nature, 2005

Pokročilé metody studia učení a paměti

- *Behaviorální techniky – viz výše*
- Elektrofyzologie – in vitro
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- **Intervenční techniky**
- IEG Imaging
- Funkční zobrazování - fMRI, PET
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

Intervenční techniky

■ Permanetní léze

- Aspirační
- Chirurgické
- Termokoagulační
- Excitotoxické
- Selektivní neurotoxiny

■ Dočasné inaktivace – funkční léze

- Implantované kanyly pro intrakraniální injeckce
- TTX a ostatní blokátory iontových kanálů
- AMPA antagonista CNQX
- Agonisté inhibiční neurotransmise – muscimol
- Lokální aplikace agonistů a antagonistů specifických receptorů

■ Genetické manipulace

- knock-out, knock-down, knock-in

Transgenní technologie

- Umožňují „vypnutí“ určitého genu nebo naopak vnesení genu cizího.
 - knock-out / knock-down
 - knock-in
- Důsledkem může být inaktivace specifické buněčné struktury nebo specifické populace
 - Germline KO
 - Selective KO
 - Cre recombinase
 - cell type-specific promoters
 - Inducible KO
 - Tet-O system

Pokročilé metody studia učení a paměti

- *Behaviorální techniky – viz výše*
- Elektrofyzologie – in vitro
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- Léze, funkční léze, genetické léze
- **IEG Imaging**
- Funkční zobrazování - fMRI, PET
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

IEG imaging

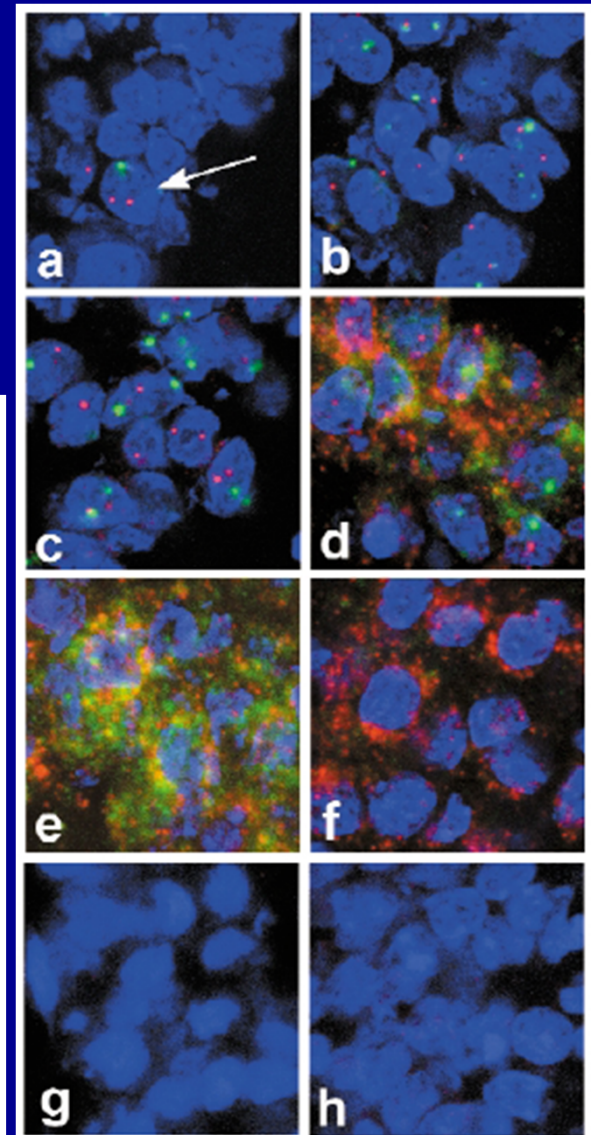
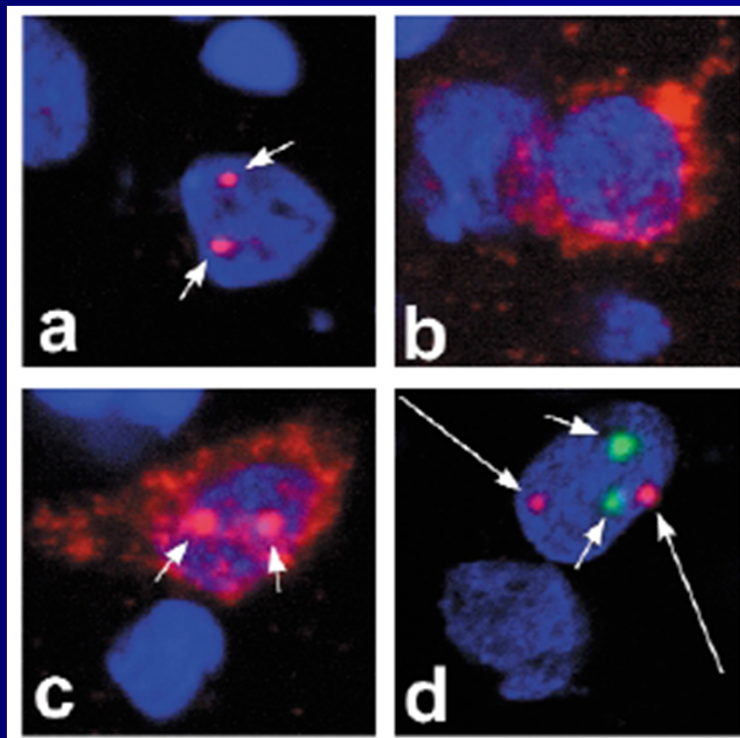
- Nervová aktivita spouští expresi genů časné odpovědi (immediate-early genes – IEGs) v neuronech
 - C-fos, zif268/erg/..., Narp, BDNF, Arc, Homer1a
- RNA
 - in situ hybridization
 - Radioaktivní
 - Fluorescenční - FISH
 - qPCR
 - Northern blot
- Protein
 - Immunohistochemistry
 - Western blot

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

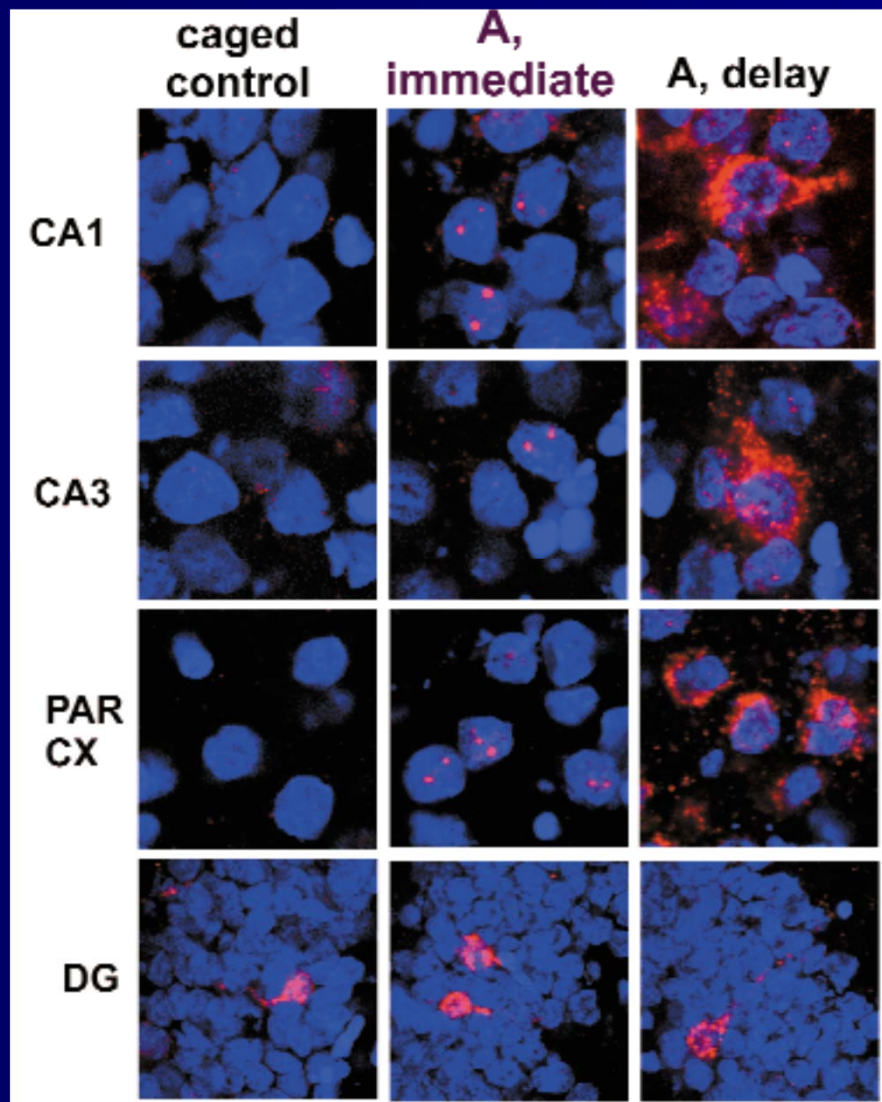
Různé druhy IEG signálu: *Arc*
Intranuclear foci -INF (a); *Arc* - cytoplasmic (b); double-positive *Arc* signal (c); double label *Arc* (zeleně) a *zif268* (červeně)(d)

Guzowski et al., 1999



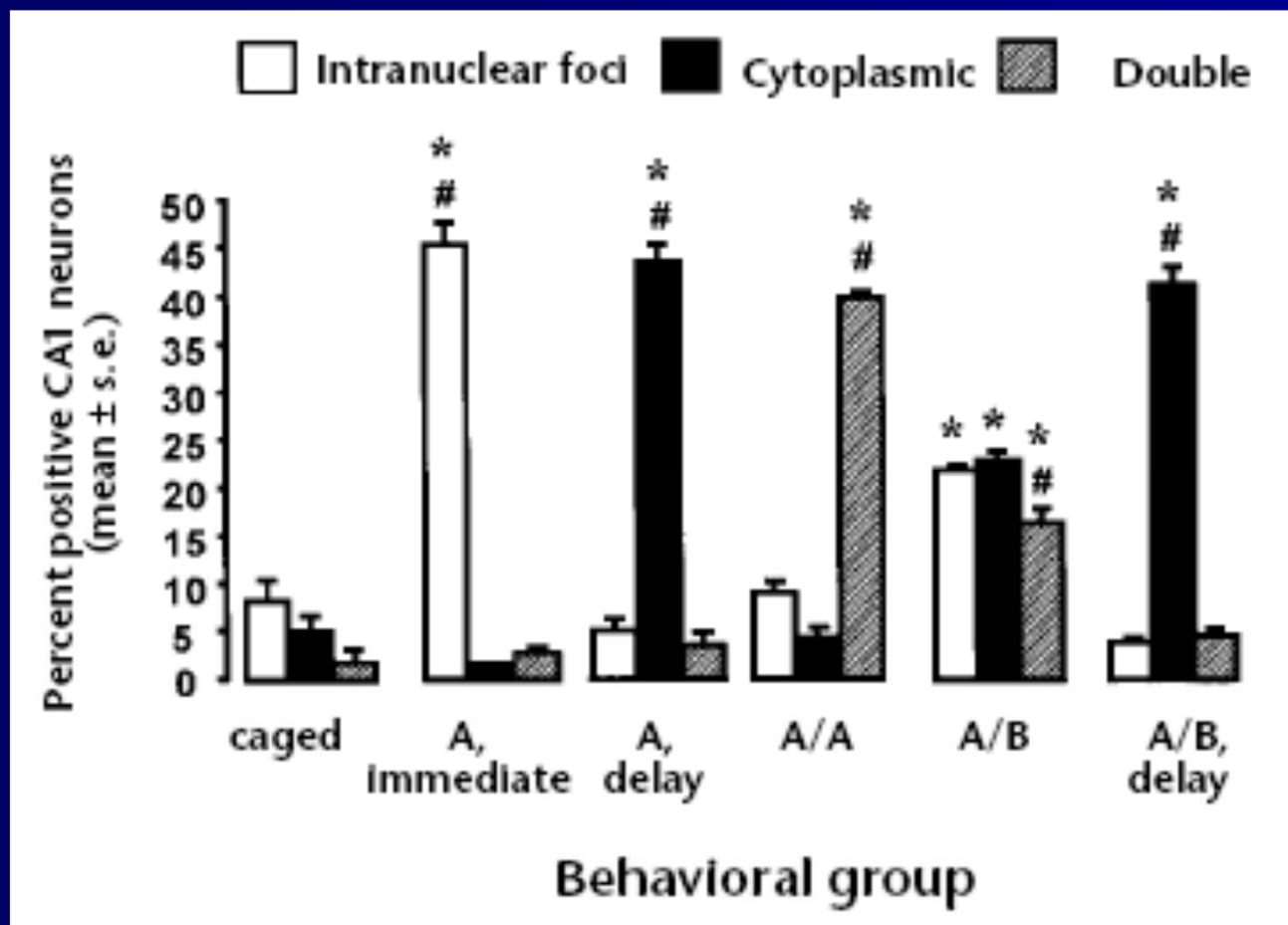
catFISH

Cellular compartment analysis of temporal activity by FISH



- Intranukleární exprese *Arc* (primární RNA transkript) se objevují v jádrech neuronů v CA1, CA3 a v kůře okamžitě po exploraci prostředí A.
 - Po 25 minutách se *Arc* mRNA objevuje v cytoplasmě.
 - Nízká exprese *Arc* v DG se nemění.
- Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci

Kontextuální specifická exprese *Arc*



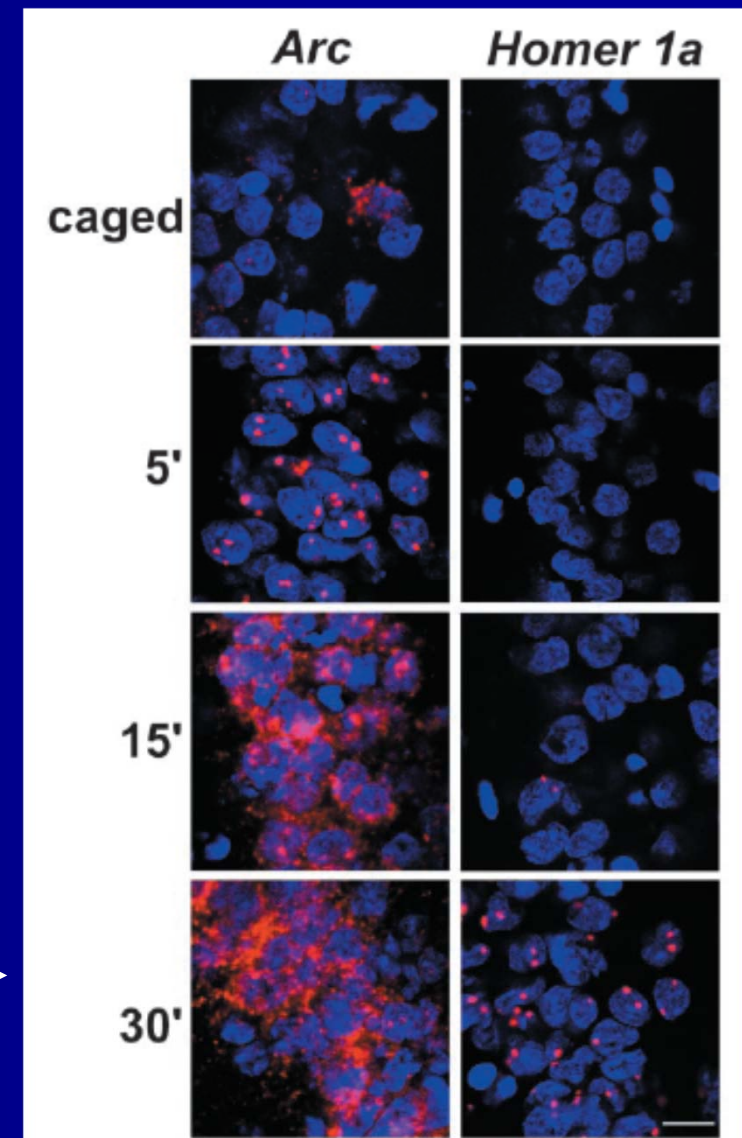
Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci

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

Zpožděný výskyt signálu z *Homer1a*

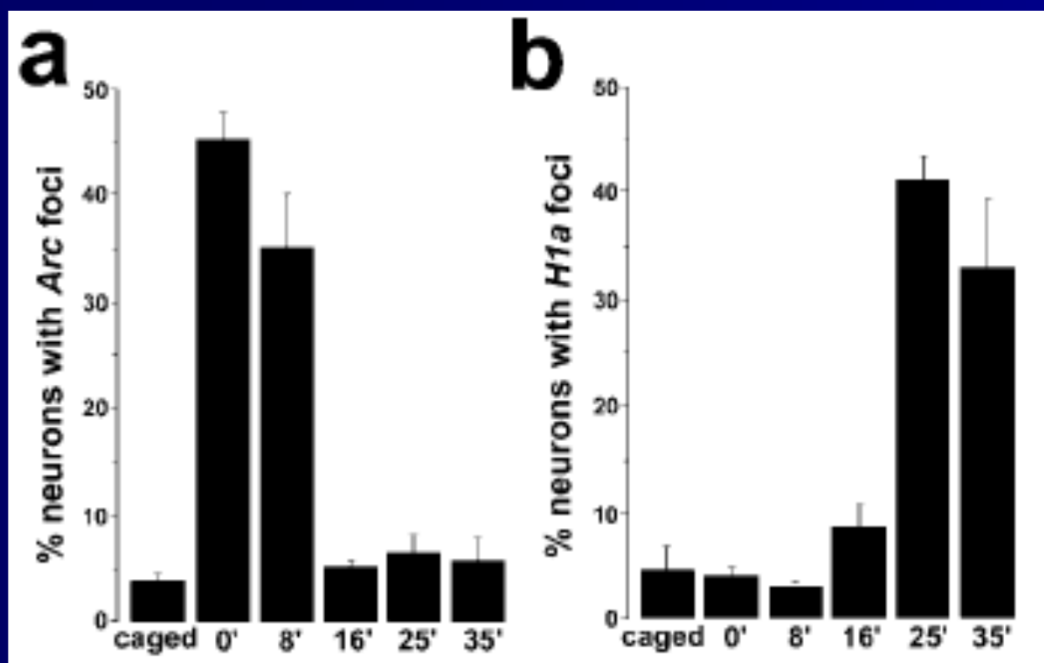
- Intranukleární signál (INF) *Homer1a* se objevuje 30 minut po indukující stimulaci (MECS).
- Toto zpoždění je dáno pozicí próby na 3'UTR na primárním transkriptu (~40 kb od počátku) a omezené elongační rychlosti RNA polymerázy II (~1.4kb/min).
- INF *H1a* se časově shoduje s cytoplasmatickým *Arc*.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

Vazdarjanova et al., 2002, J Neurosci

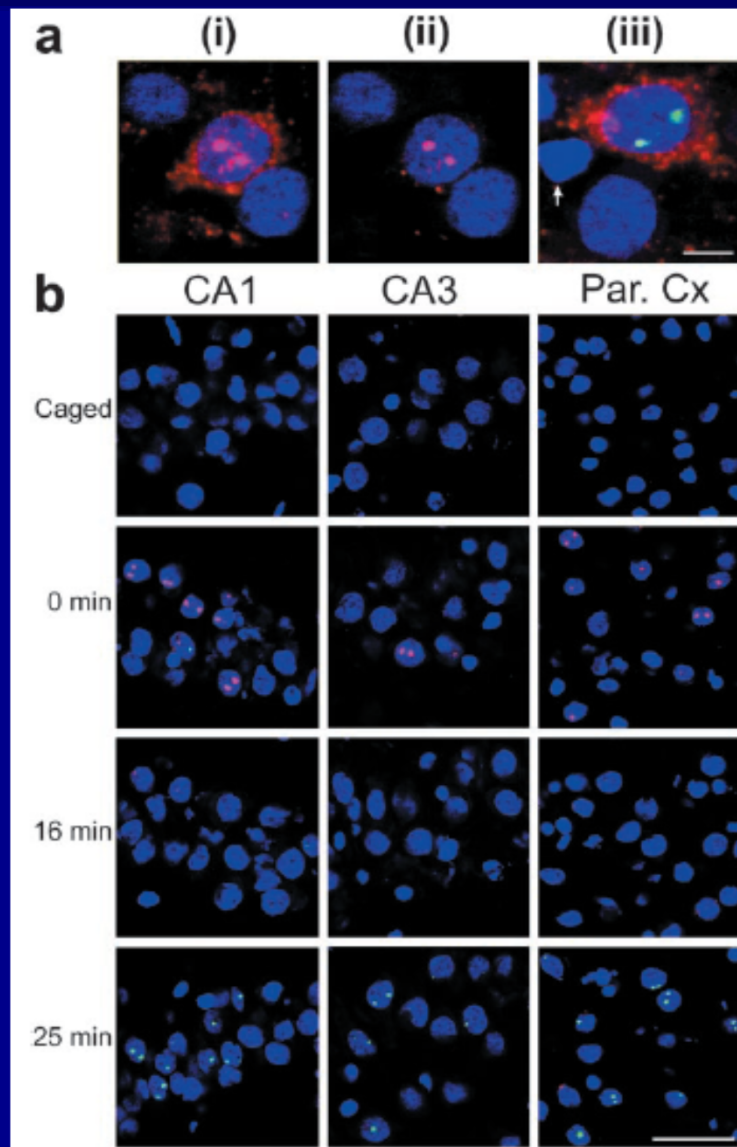


Arc a *Homer1a* INF pocházejí z různých časových úseků

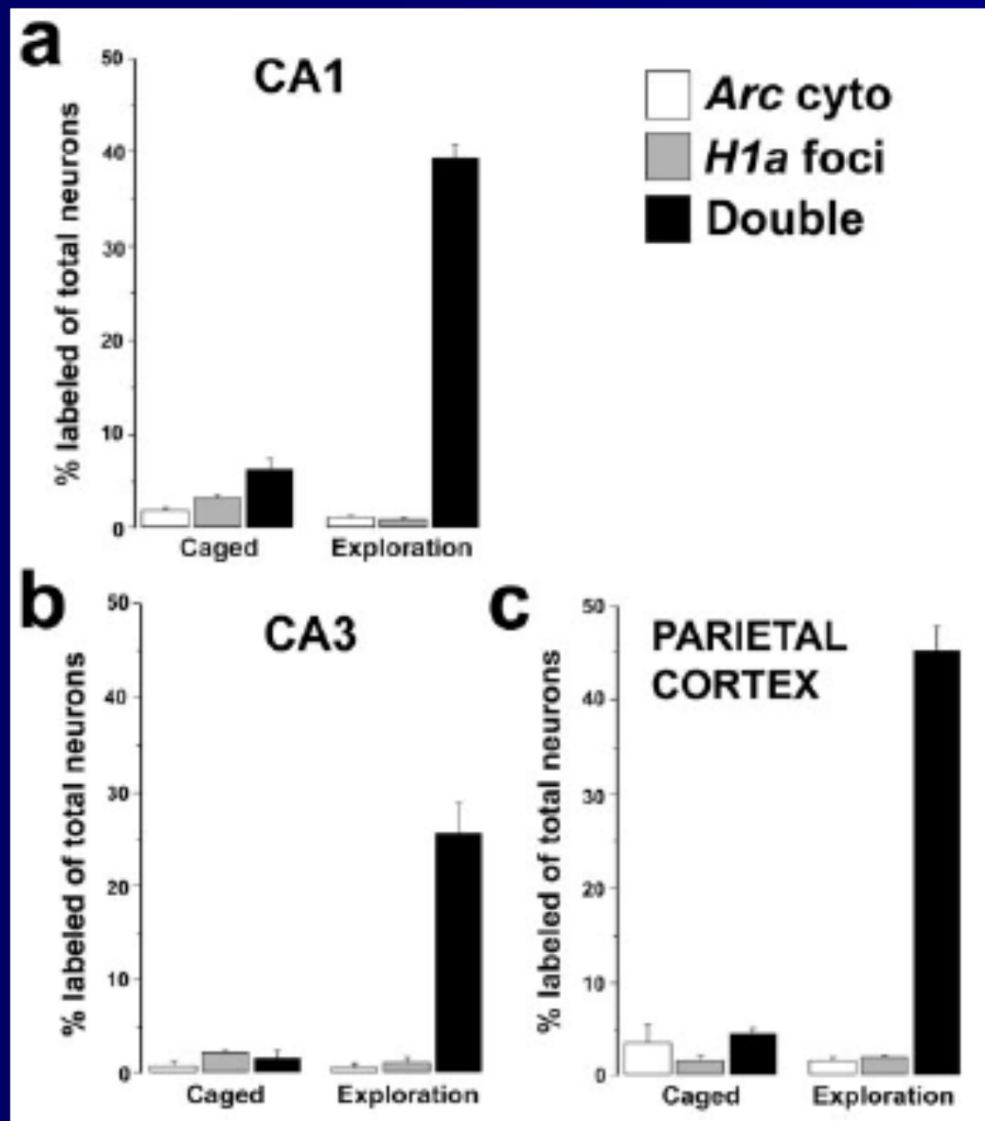
- Časový odstup *Homer1a* signálu (zeleně) je zachován i po exploraci nového prostředí (open field).



Vazdarjanova et al., 2002, J Neurosci

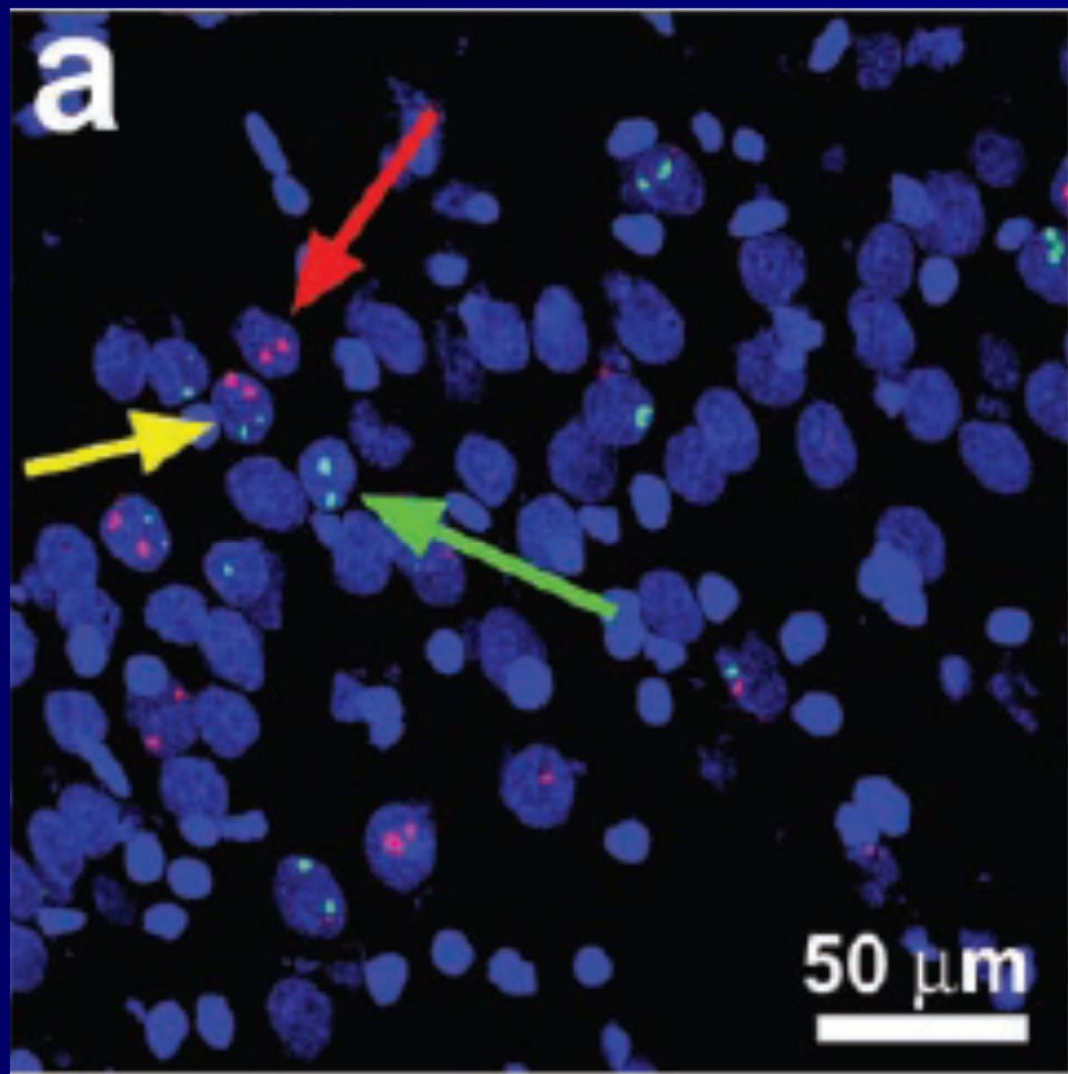


INF *H1a* kolokalizuje s cytoplazmatickým *Arc*



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

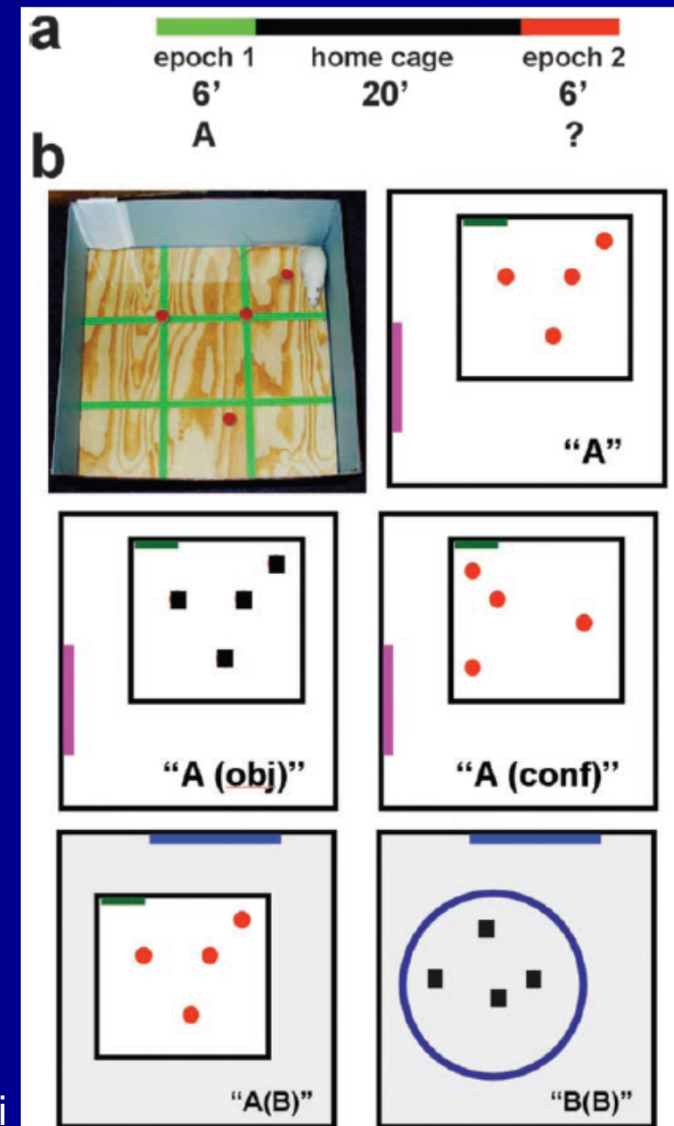
Arc / *Homer1a* catFISH



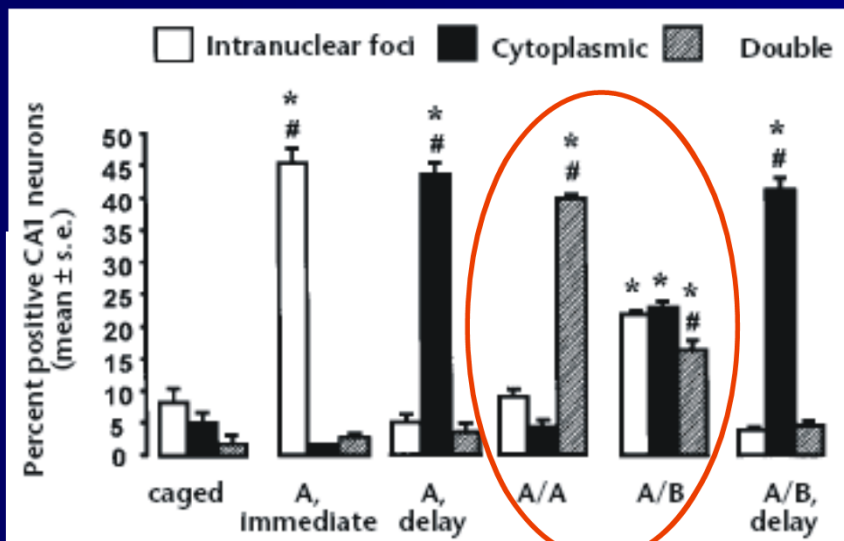
Homer1a (zelený INF) značí neurony aktivní během první epizody ~25-30 min před smrtí zvířete. *Arc* (červený INF) značí neurony aktivní během druhé epizody bezprostředně před usmrcením. Double-positivní neurony byly aktivní během obou epizod.

Změny v prostředí

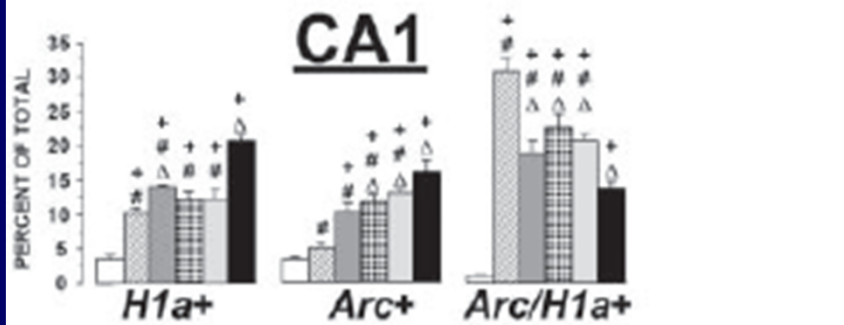
- Zvířata byla vypuštěna na 6 min jednou v prostředí A, navrácena do svých klecí, a 20 min později podruhé vypuštěna v tomtéž prostředí A, v modifikovaném prostředí A' buď s jinými objekty Aobj, s jiným uspořádáním stejných objektů Aconf, anebo s jinými vzdálenými orientačními značkami Ab, anebo v úplně 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

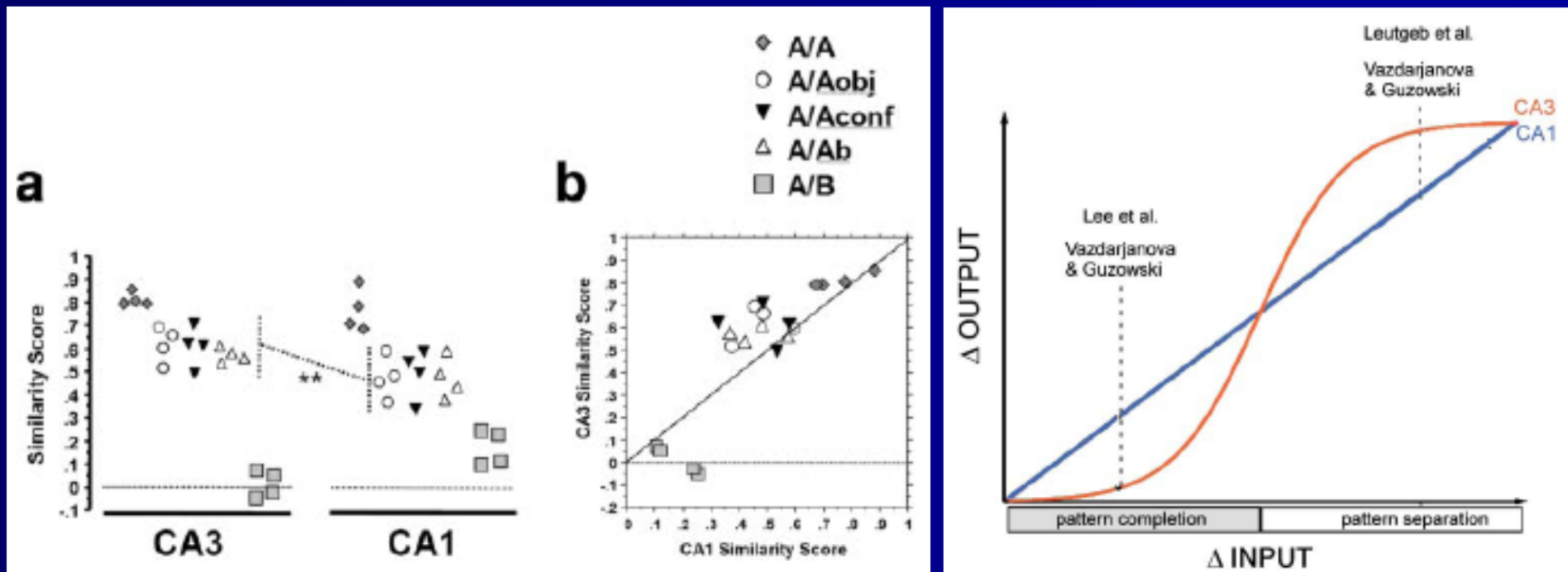


Vazdarjanova and Guzowski, 2004, J Neurosci

- Ve stejném prostředí (A/A) se aktivní neuronální skupiny (neural ensembles) v CA1 i v CA3 z valné části překrývají.
- V různých prostředích (A/B) jsou aktivní skupiny v CA3 statisticky nezávislé, zatímco v CA1 nadále přetrvává jistá podobnost skupin.
- Při mírných změnách (A/A') je podobnost vyšší v CA3 než v CA1.

Kontextuální specifická IEG exprese v CA3 a CA1 se liší

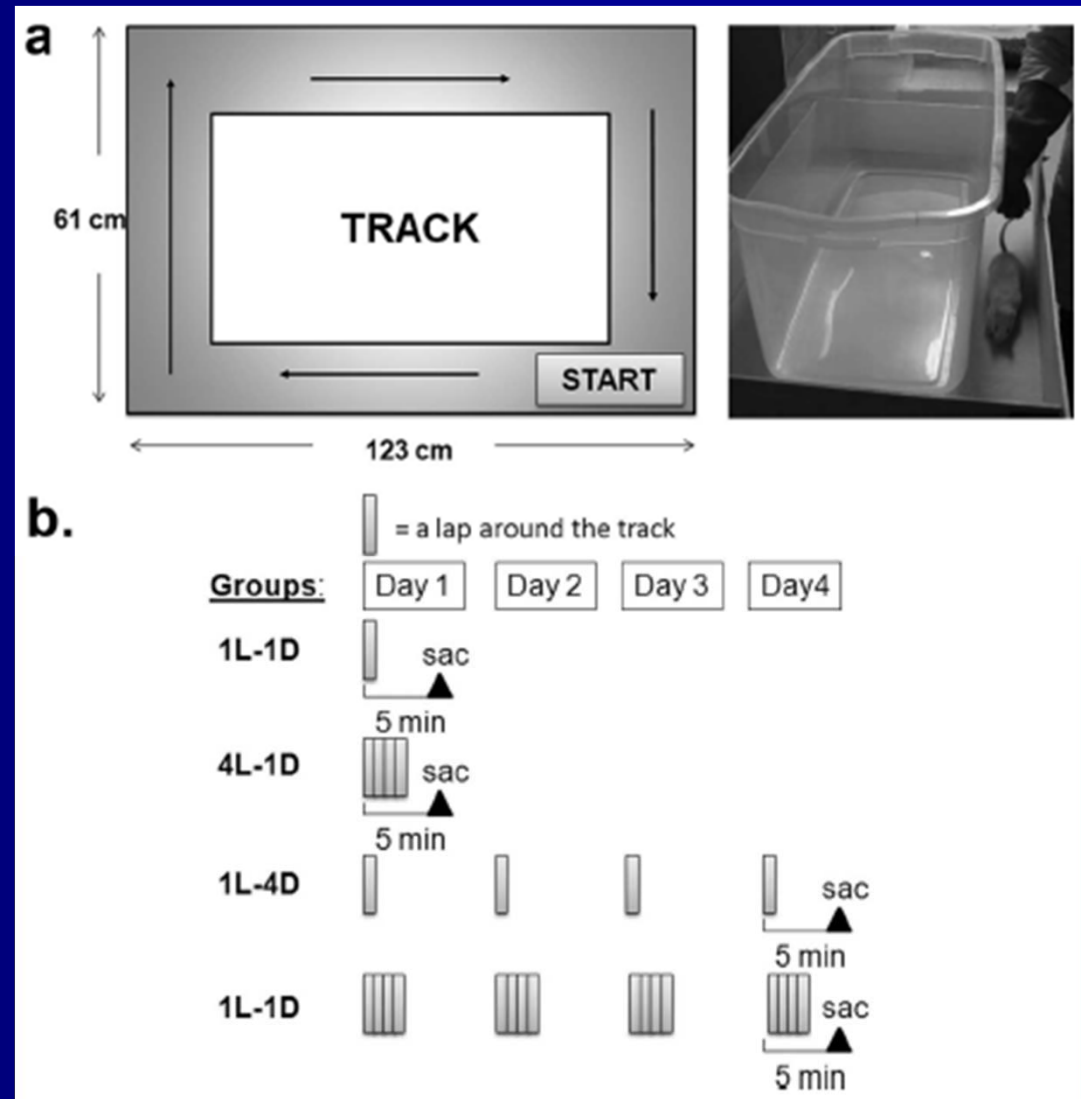
Odpověď na změnu prostředí je v CA1 postupná, zatímco v CA3 se blíží dvěma stavům buď totožných, nebo diametrálně odlišných populací. To ukazuje na dynamickou rovnováhu mezi separací (pattern separation) a doplněním vzorců (pattern completion) v CA3, nikoliv v CA1.



Kolik aktivity je třeba ke spuštění exprese *Arc*?

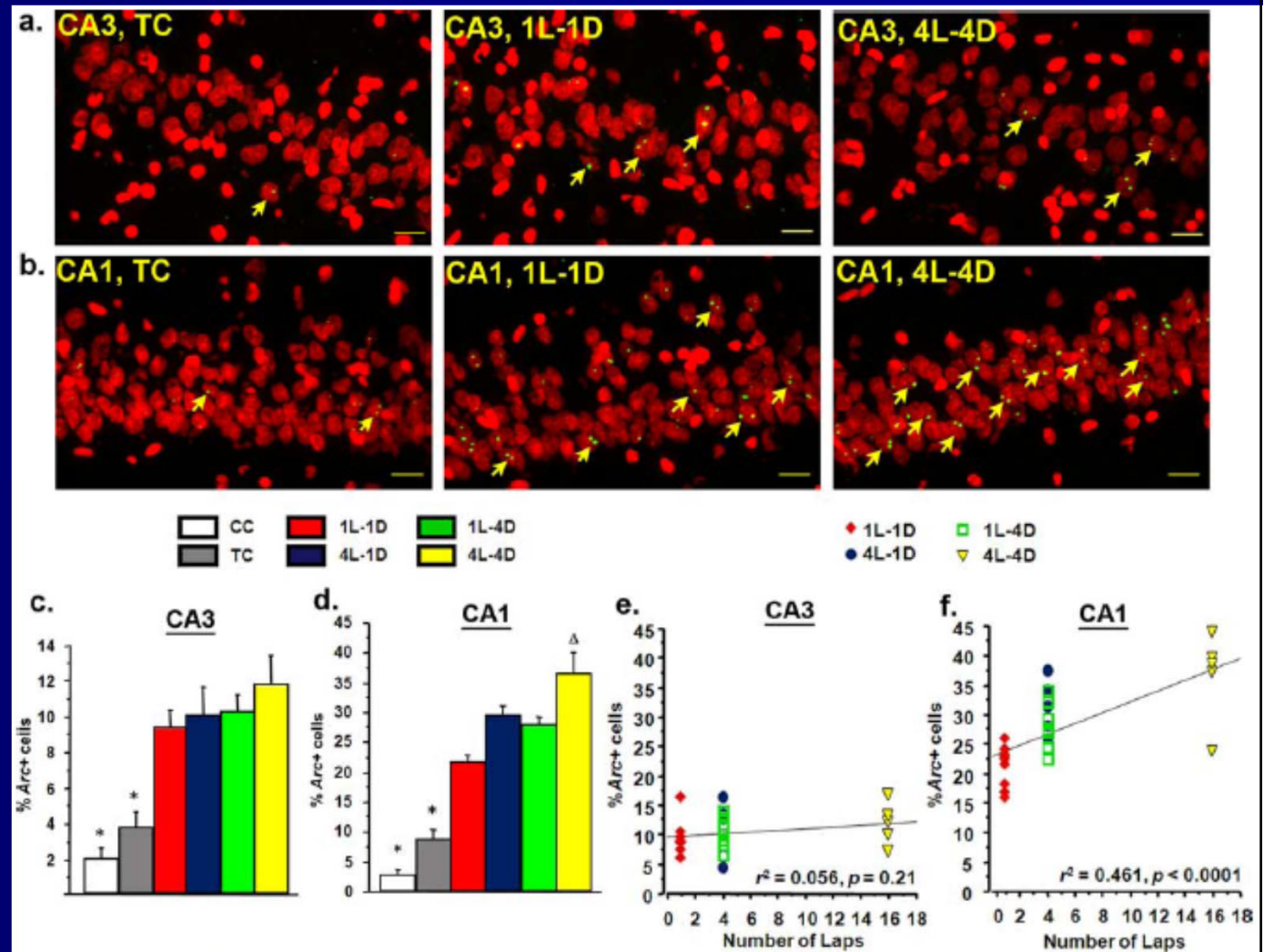
- Track maze –potkan projde každým místem právě jednou v každém kole
- Je aktivita place cells vyvolaná jedinou návštěvou „place field“ dostatečná ke spuštění exprese *Arc*?
- Posílí opakování tuto expresi?

Miyashita et al., 2009, J Neurosci



Jednorázová zkušenost spouští expresi *Arc* v hipokampu

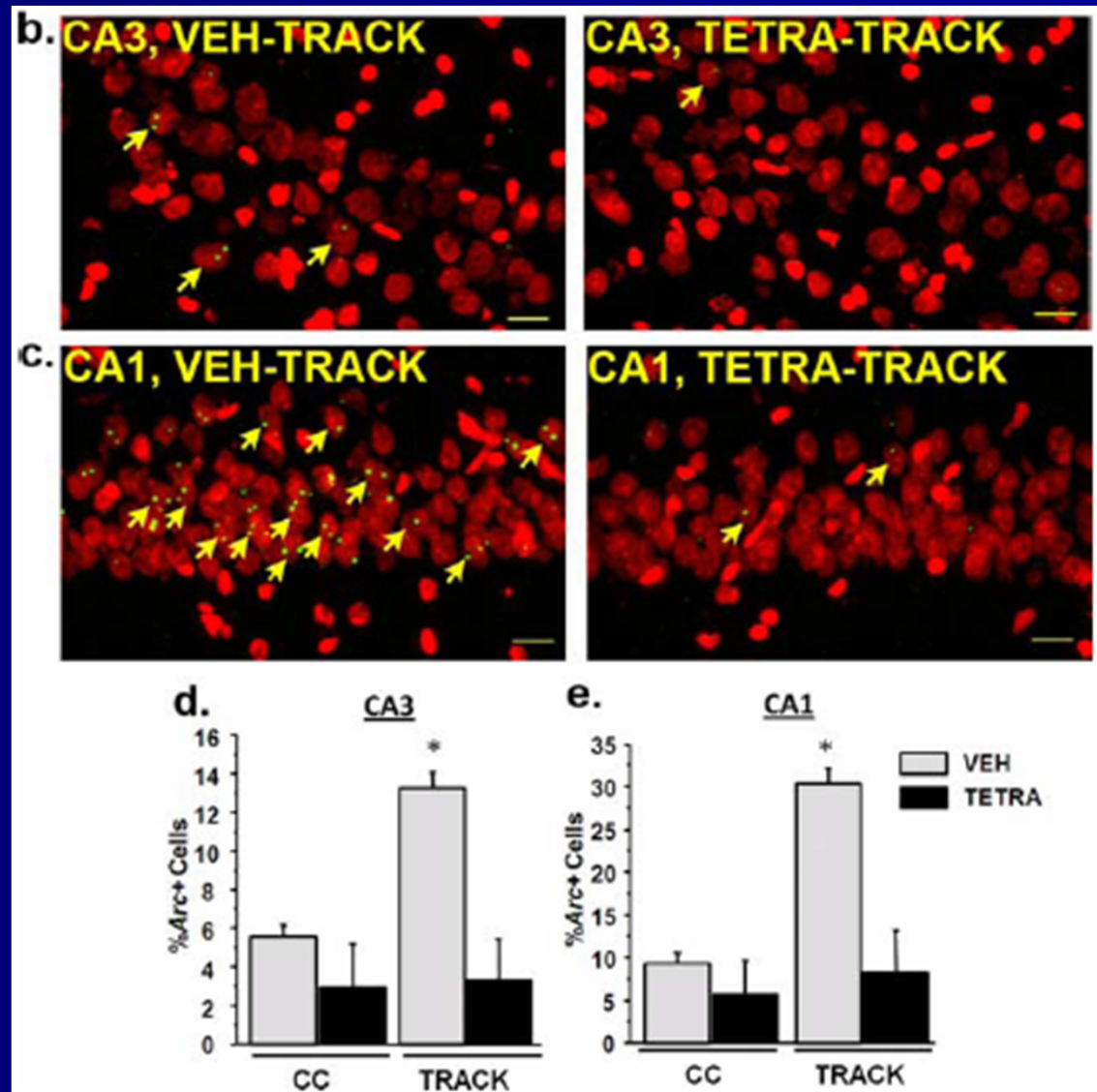
- Populace *Arc+* neuronů v CA3 byly kompletní už po prvním kole, zatímco v CA1 se *Arc+* populace rozrůstala s opakováním.
- *Arc* může být součástí molekulární kaskády od neuronální aktivity k synaptické plasticitě.



Vede aktivita place cells vždy 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



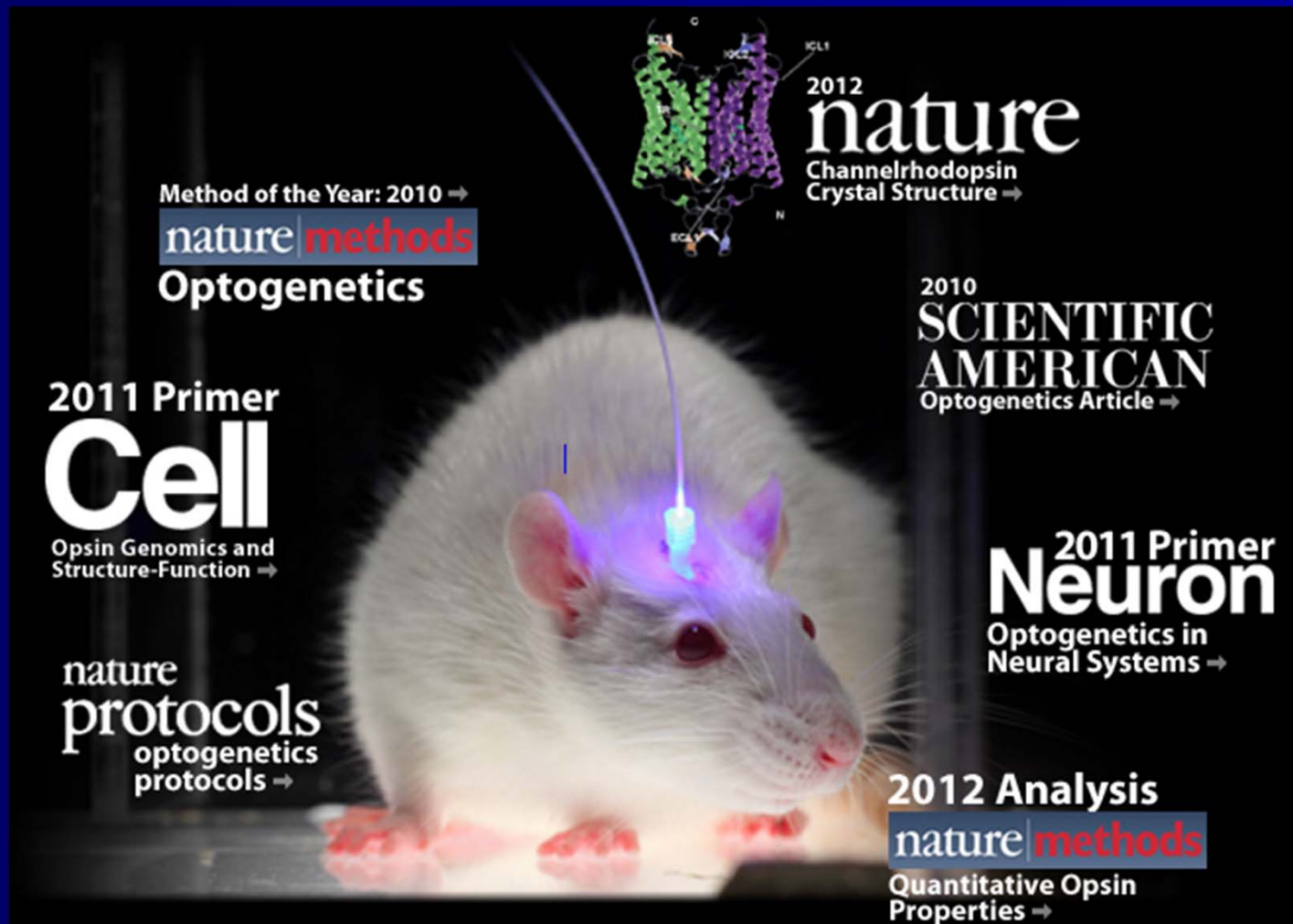
Pokročilé metody studia učení a paměti

- *Behaviorální techniky – viz výše*
- Elektrofyzologie – in vitro
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- Léze, funkční léze, genetické léze
- IEG Imaging
- Funkční zobrazování - fMRI, PET
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

Optogenetika

Stanford Optogenetics Resource Center:

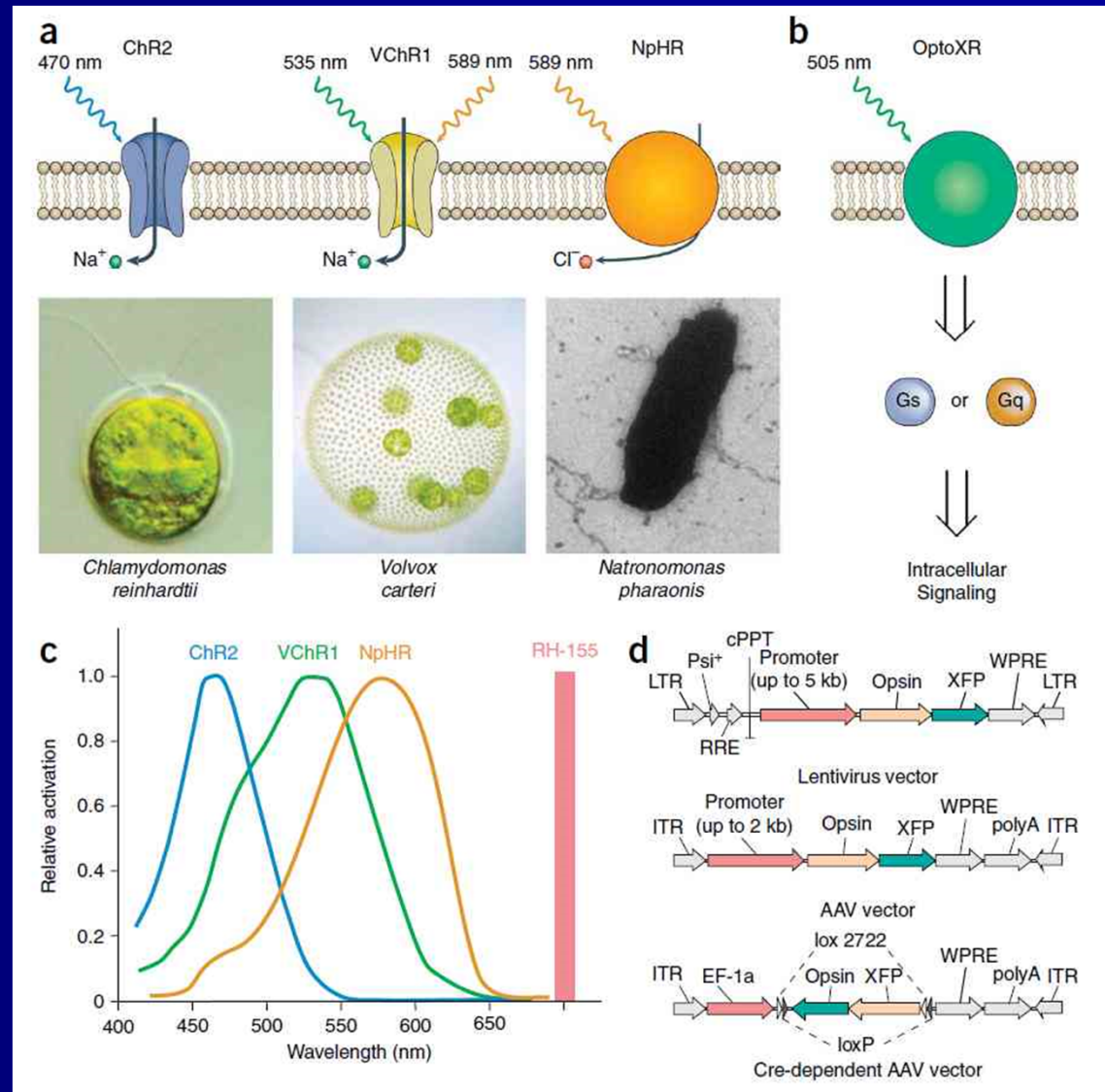
<http://www.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/>



Optogenetika

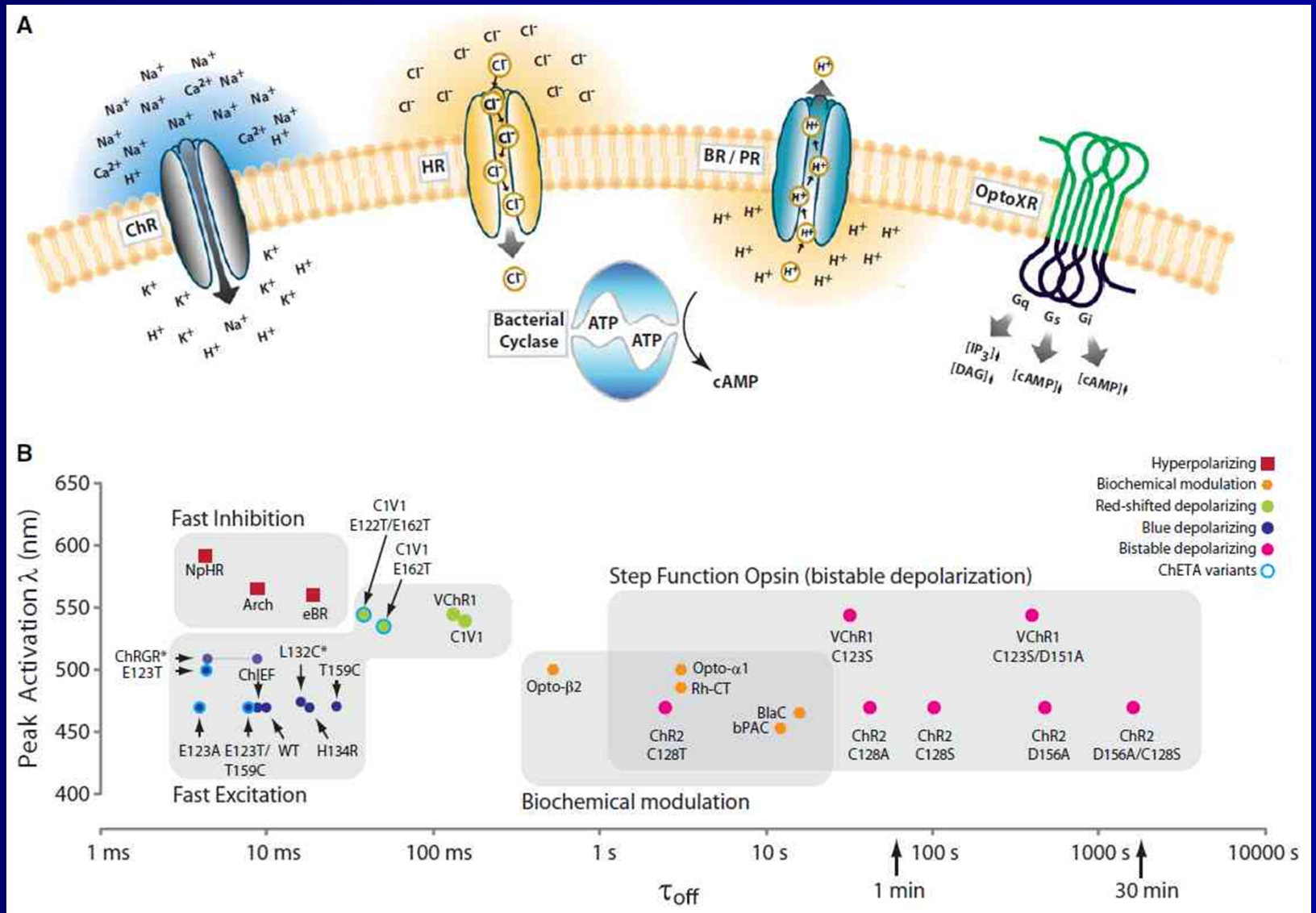
- Kationtový kanál
- Chloridová pumpa
- Světločivný chimerický GPCR
- Kombinace různých vlnových délek
- Virové vektory
- Kombinace s dalšími transgeny (Cre rekombináza, tetracycline transactivator (tTa))

Zhang et al., 2010, Nature Prot



Opsiny

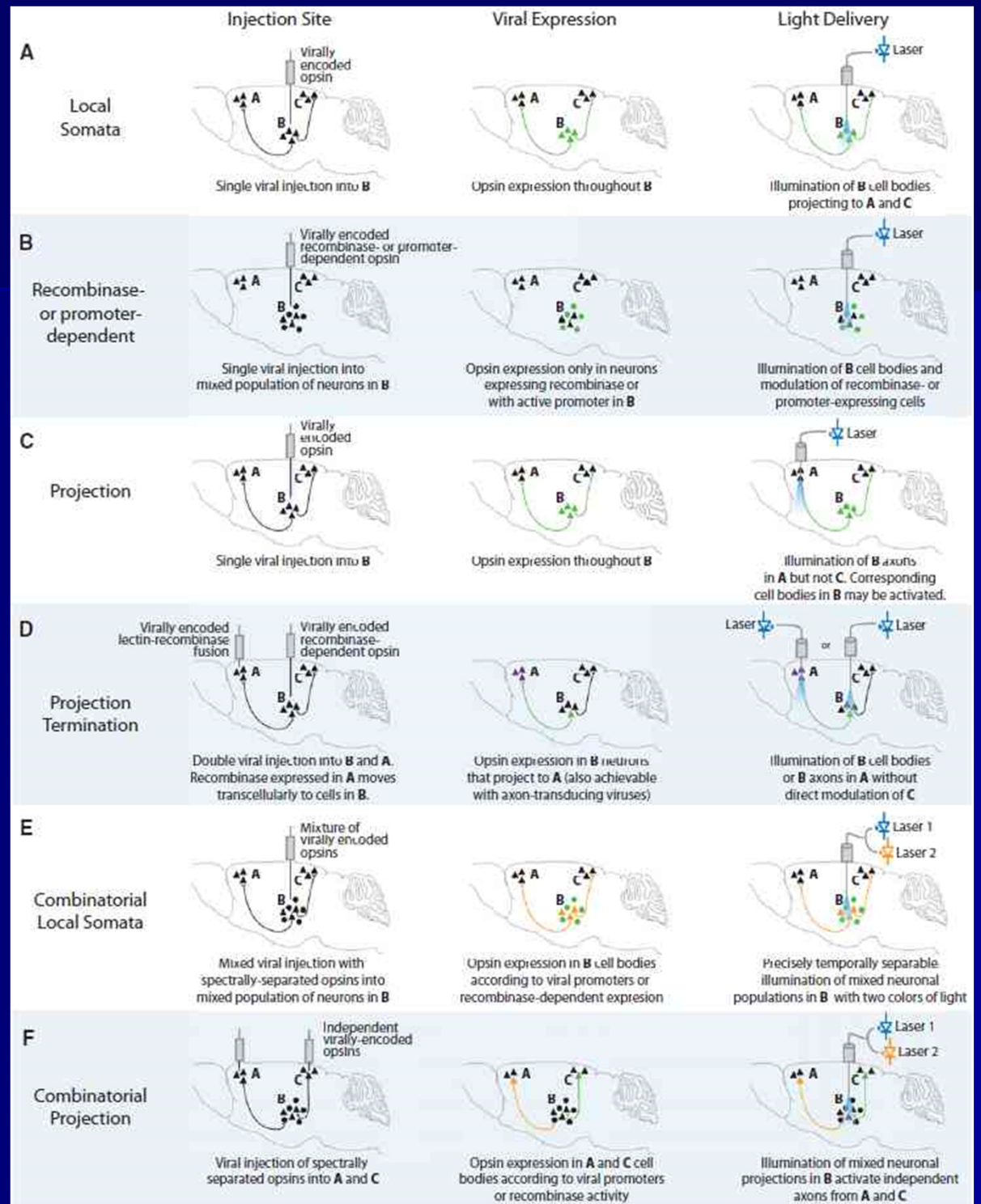
Yizhar et al., 2011, Neuron



Opsiny

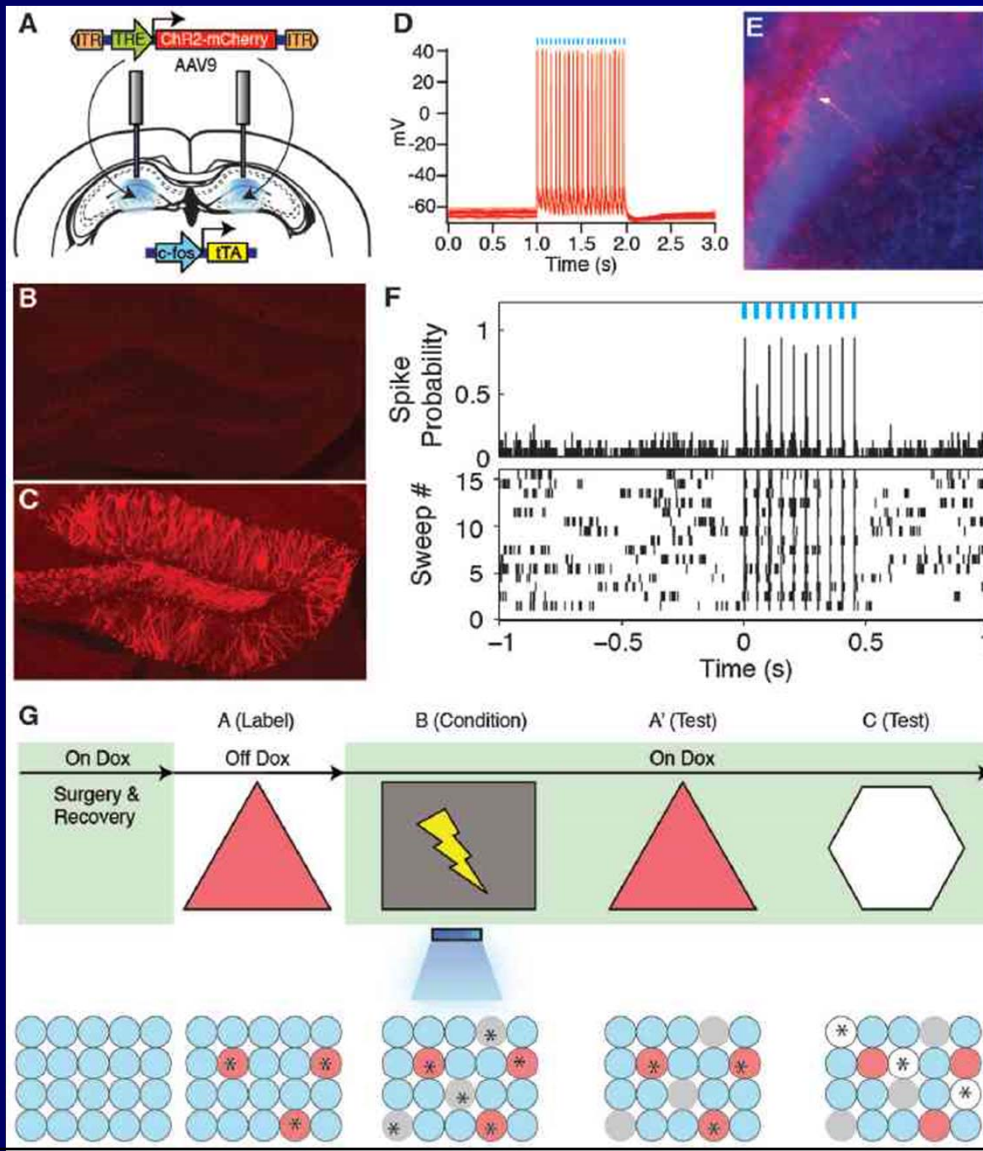
Opsin	Mechanism	Peak Activation λ	Off Kinetics (τ , ms)*	Kinetics References
Blue/Green Fast Excitatory				
ChR2	Cation channel	470 nm	~10 ms	Boyden et al., 2005; Nagel et al., 2003
ChR2(H134R)	Cation channel	470 nm	18 ms	Nagel et al., 2005; Gradinaru et al., 2007
ChR2 (T159C)	Cation channel	470 nm	26 ms	Bemdt et al., 2011
ChR2 (L132C)	Cation channel	474 nm	16 ms*	Kleinlogel et al., 2011
ChETAs: ChR2(E123A) ChR2(E123T) ChR2(E123T/T159C)	Cation channel	470 nm (E123A) 490 nm (E123T)	4 ms (E123A) 4.4 ms (E123T) 8 ms (E123T/T159C)	Gunaydin et al., 2010; Bemdt et al., 2011
ChIEF	Cation channel	450 nm	~10 ms	Lin et al., 2009
ChRGR	Cation channel	505 nm	4-5 ms* (8-10ms)	Wang et al., 2009; Wen et al., 2010
Yellow/Red Fast Excitatory				
VChR1	Cation channel	545 nm	133 ms	Zhang et al., 2008
C1V1	Cation channel	540 nm	156 ms	Yizhar et al., 2011a
C1V1 ChETA (E162T)	Cation channel	530 nm	58 ms	Yizhar et al., 2011a
C1V1 ChETA (E122T/E162T)	Cation channel	535 nm	34 ms	Yizhar et al., 2011a
Bistable Modulation				
ChR2-step function opsins (SFOs)	Cation channel	470 nm activation / 590 nm deactivation	2 s (C128T); 42 s (C128A) 1.7 min (C128S) 6.9 min (D156A) 29 min (I28S/156A)	Bemdt et al., 2009; Bamann et al., 2010; Yizhar et al., 2011a
VChR1-SFOs	Cation channel	560 nm activation / 390 nm deactivation	32 s (C123S) 5 min (I23S/151A)	
Yellow/Red Inhibitory				
eNpHR3.0	Chloride pump	590 nm	4.2 ms	Gradinaru et al., 2010
Green/Yellow Inhibitory*				
Arch/ArchT	Proton pump	566 nm	9 ms	Chow et al., 2010
eBR	Proton pump	540 nm	19 ms	Gradinaru et al., 2010
Biochemical Modulation				
Opto- β 2AR	\uparrow G $_{\beta\gamma}$ -protein signaling	500 nm	0.5 s	Airan et al., 2009
Opto- α 1AR	\uparrow G $_{\alpha}$ -protein signaling	500 nm	3 s	Airan et al., 2009
Rh-CT(5-HT1A)	\uparrow G $_{\alpha o}$ -protein signaling	485 nm	3 s	Oh et al., 2010
bPAC	\uparrow cAMP	453 nm	12 s	Stierl et al., 2011
BlaC	\uparrow cAMP	465 nm	16 s (50% decay)	Ryu et al., 2010

Targeting

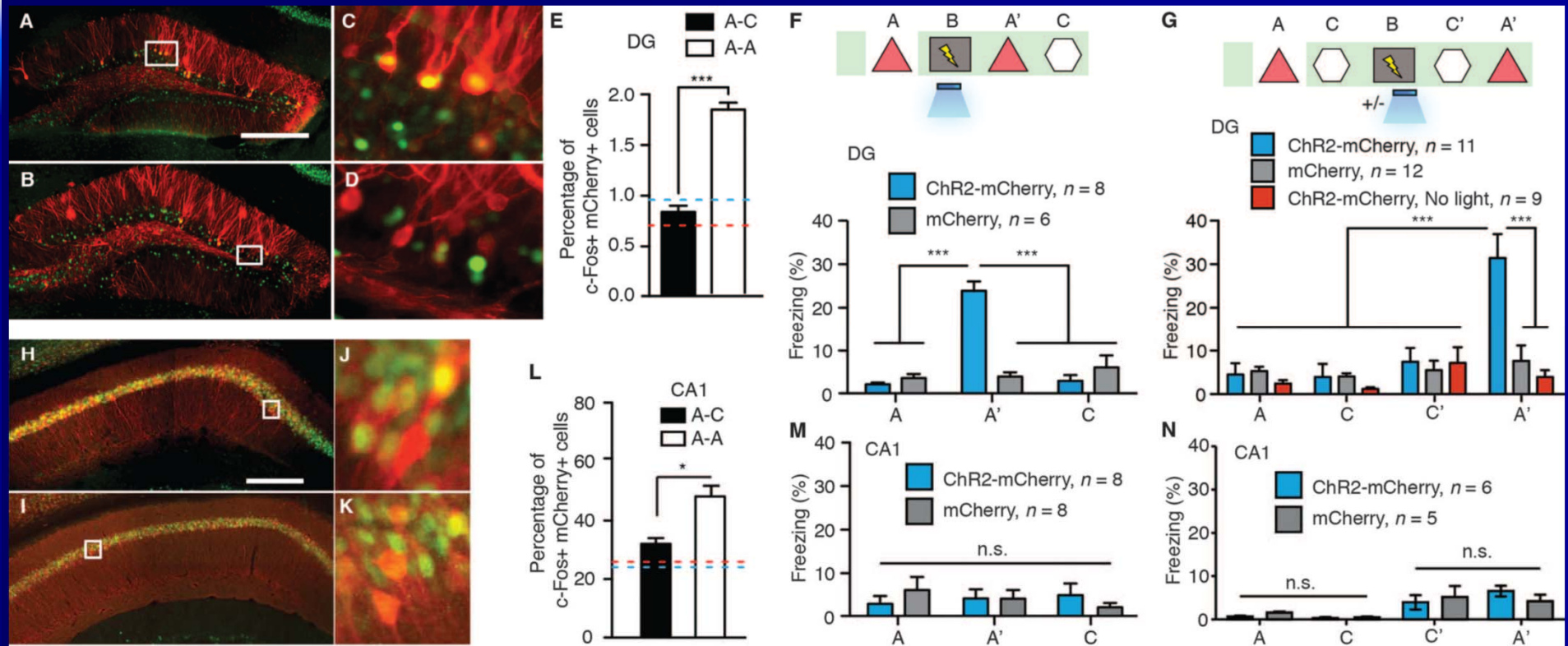


Creating false memories

Ramirez et al., 2013, Science



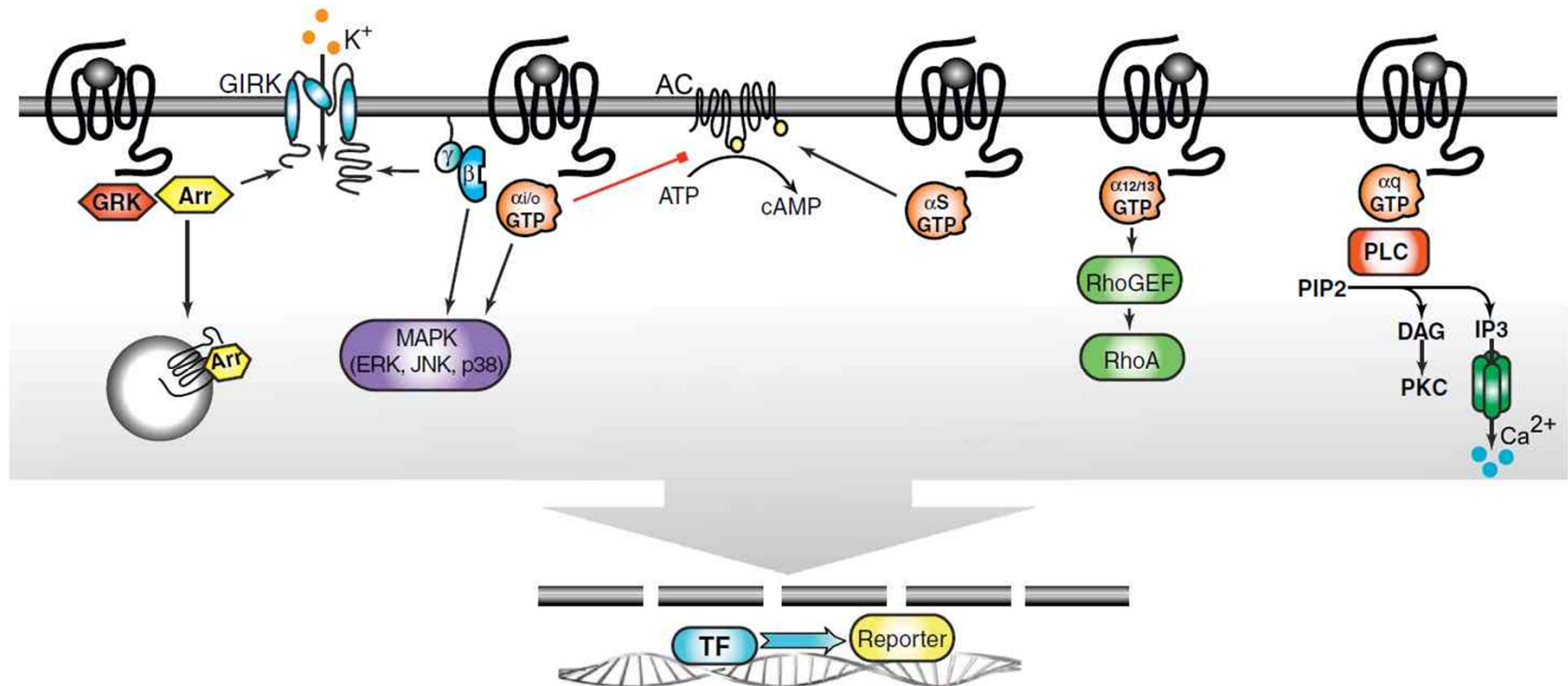
Creating false memories



Ramirez et al., 2013, Science

Chemogenetika - GPCR

G-protein-coupled receptors

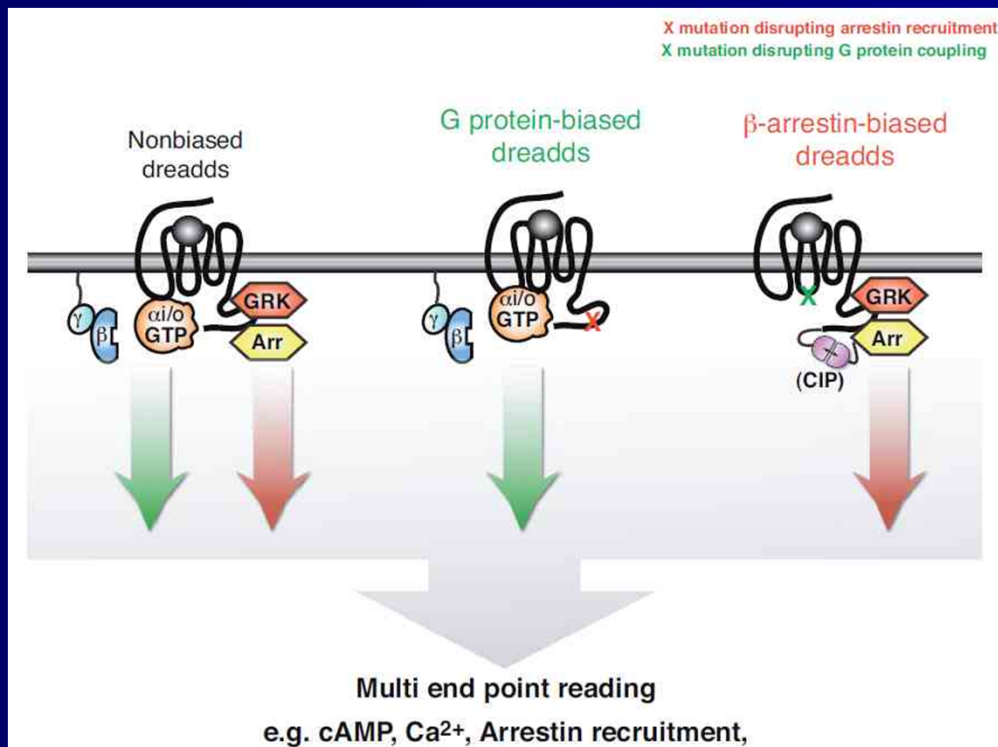


Drug Discovery Today

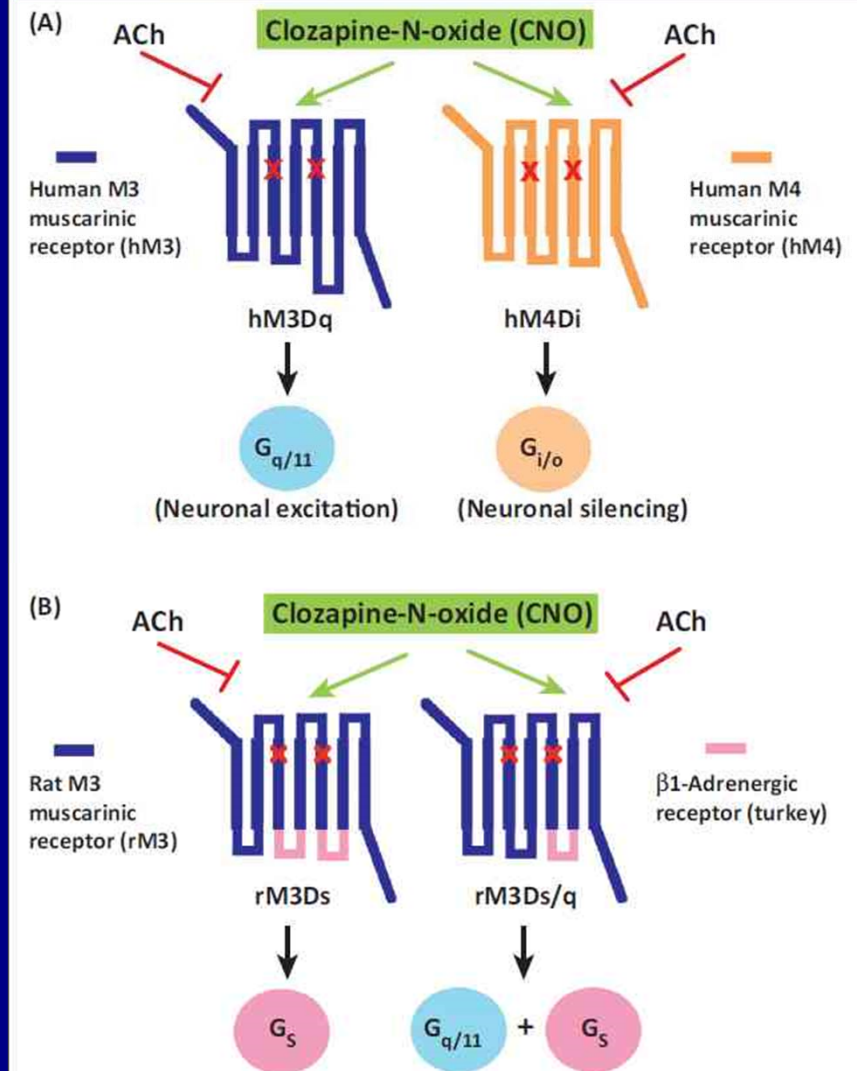
Chemogenetika - DREADDs

Wess et al., 2013, Trends Pharm Sci

Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs CNO (Clozapine-N-Oxide)

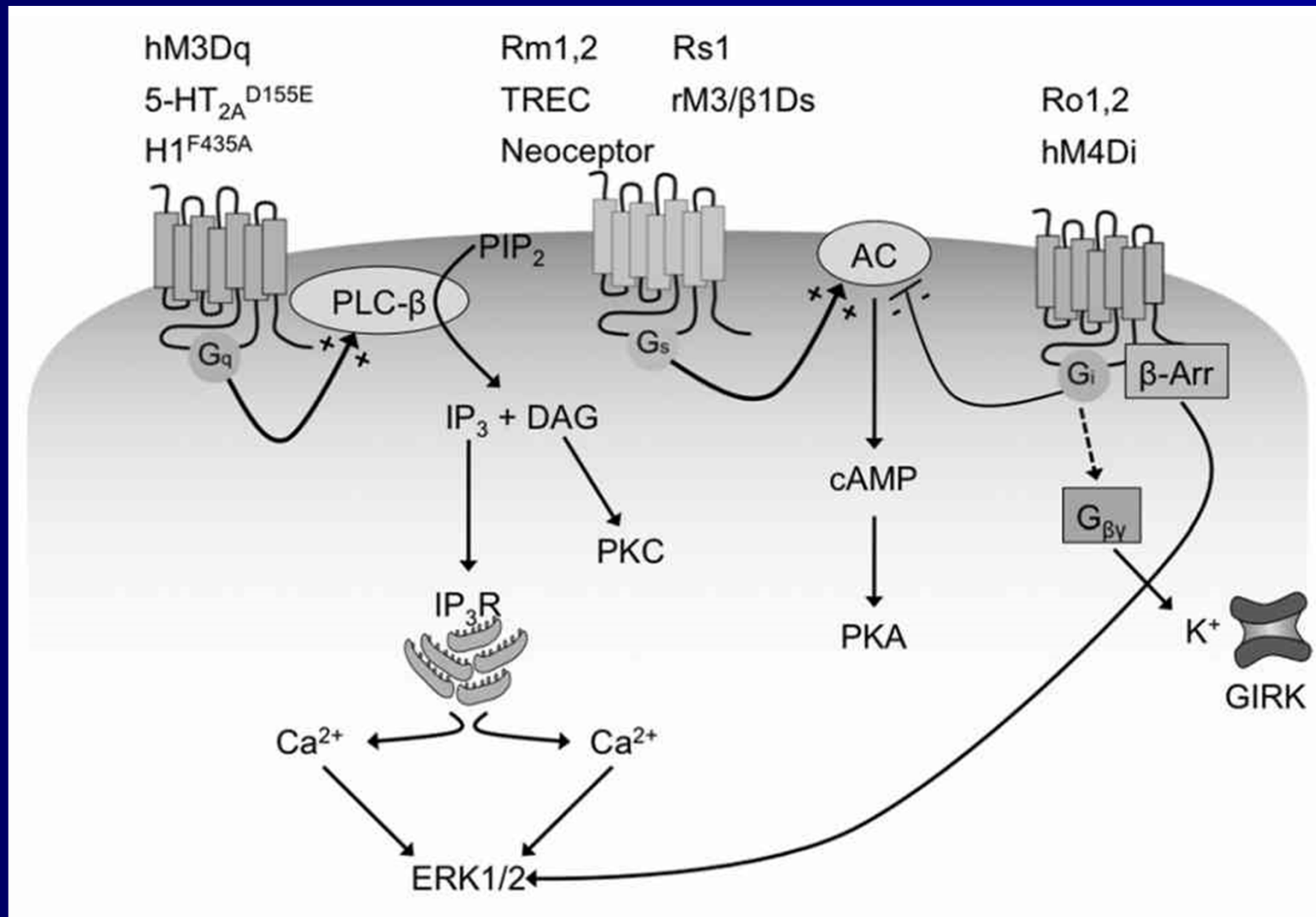


Drug Discovery Today

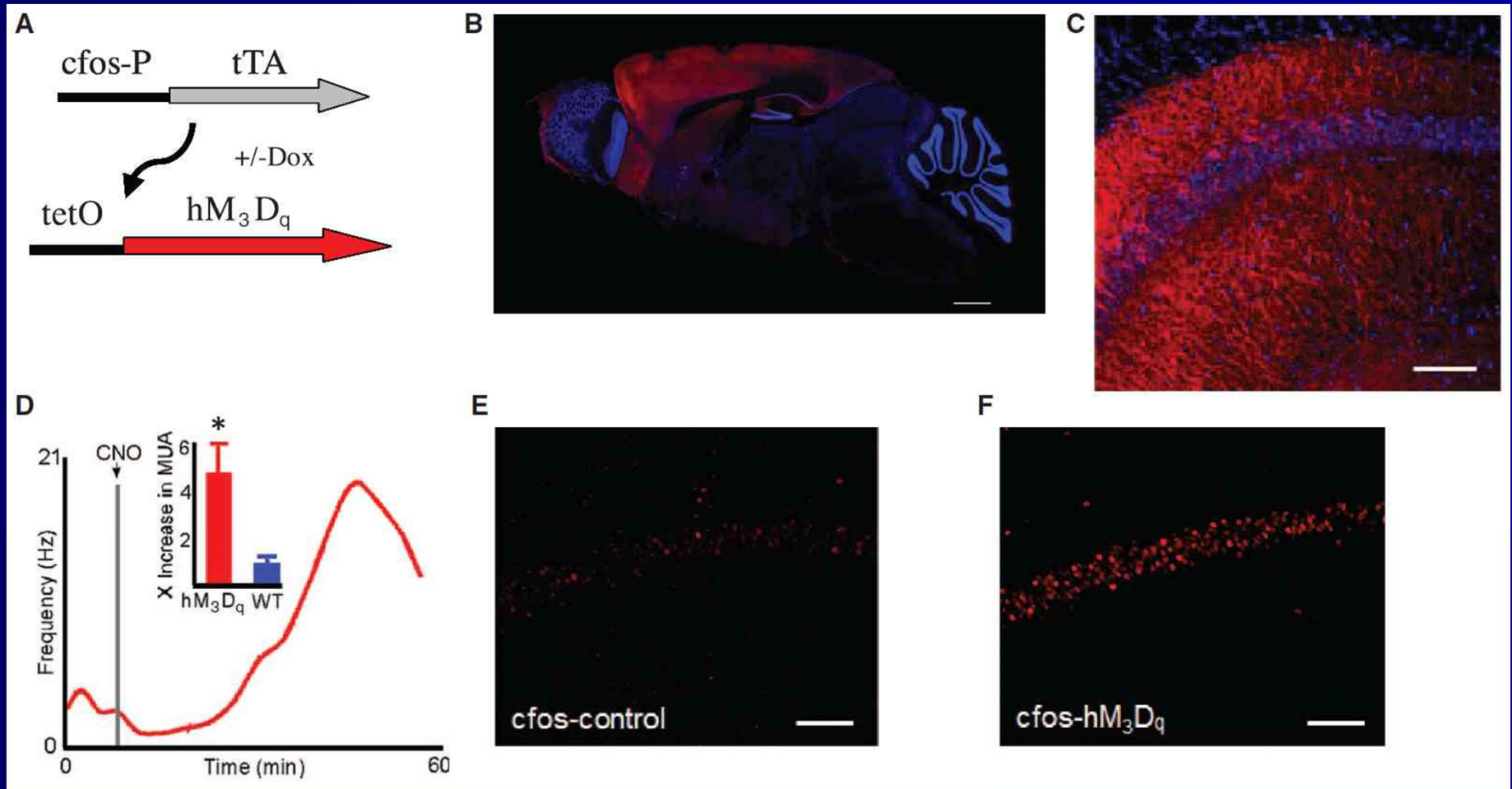


TRENDS in Pharmacological Sciences

hM3Dq - hM4Di

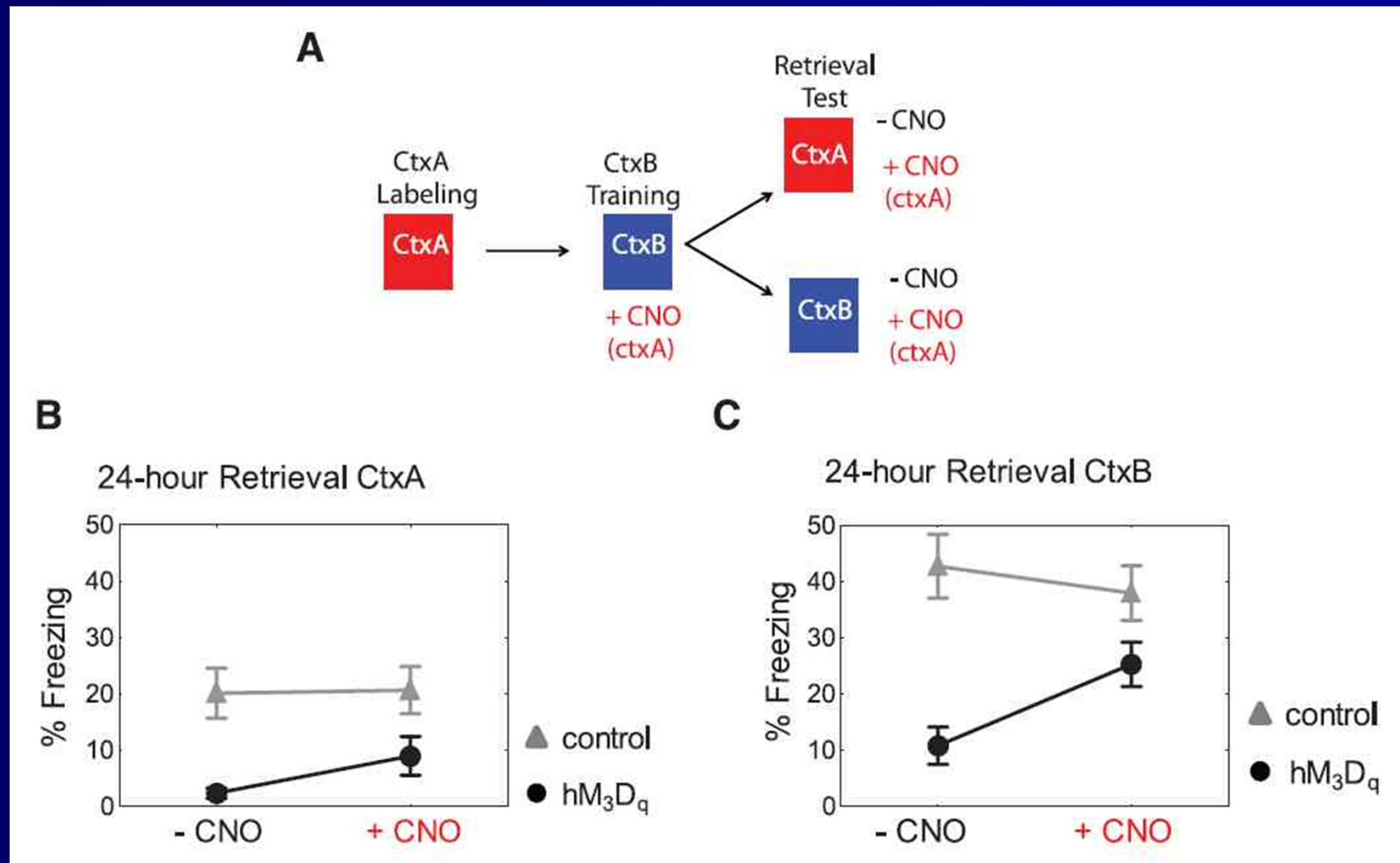


Aktivace hM3Dq

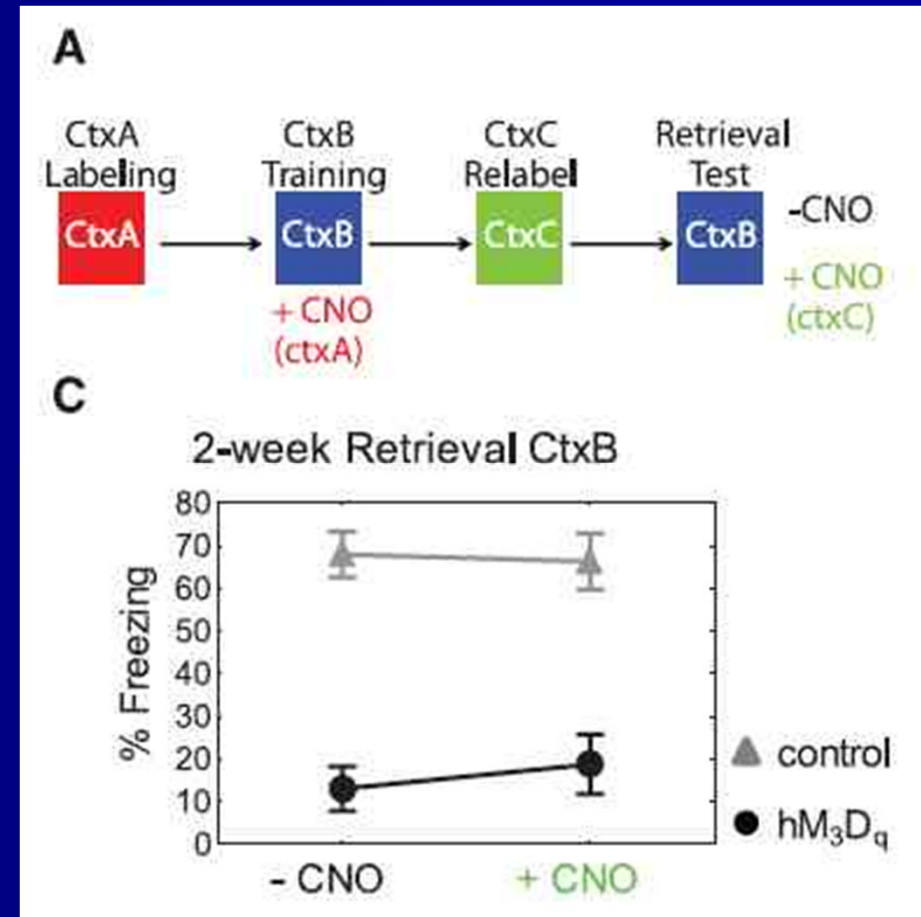
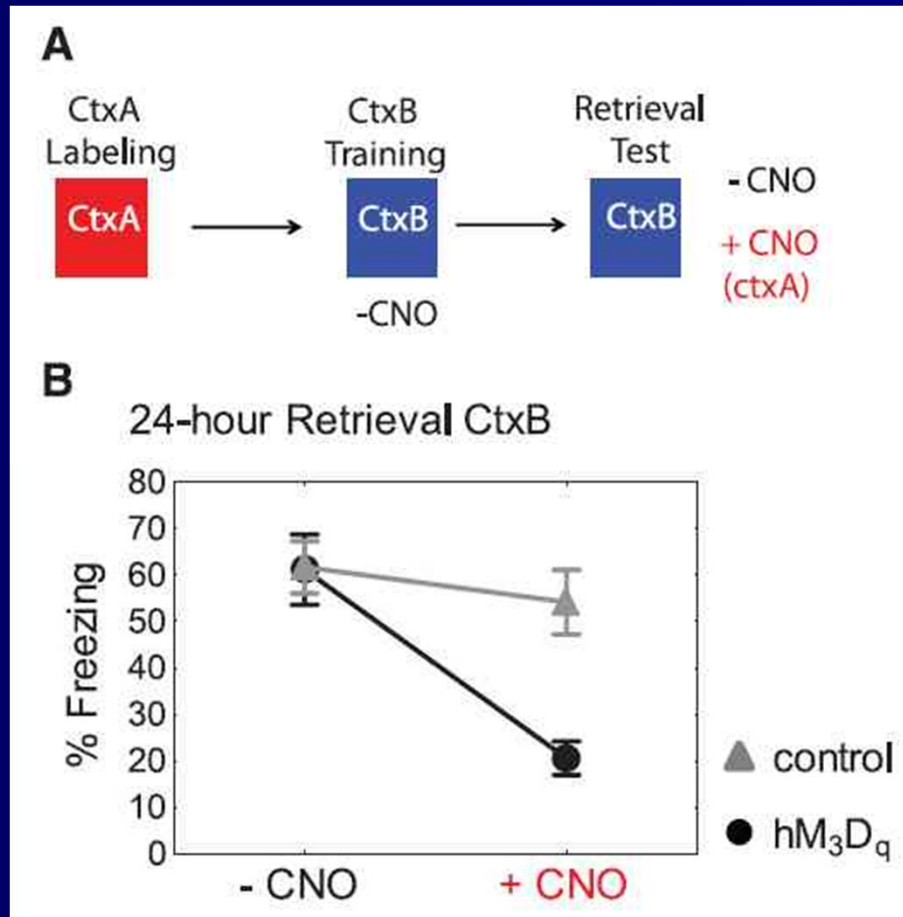


Garner et al., 2012, Science

Synthetic memory trace



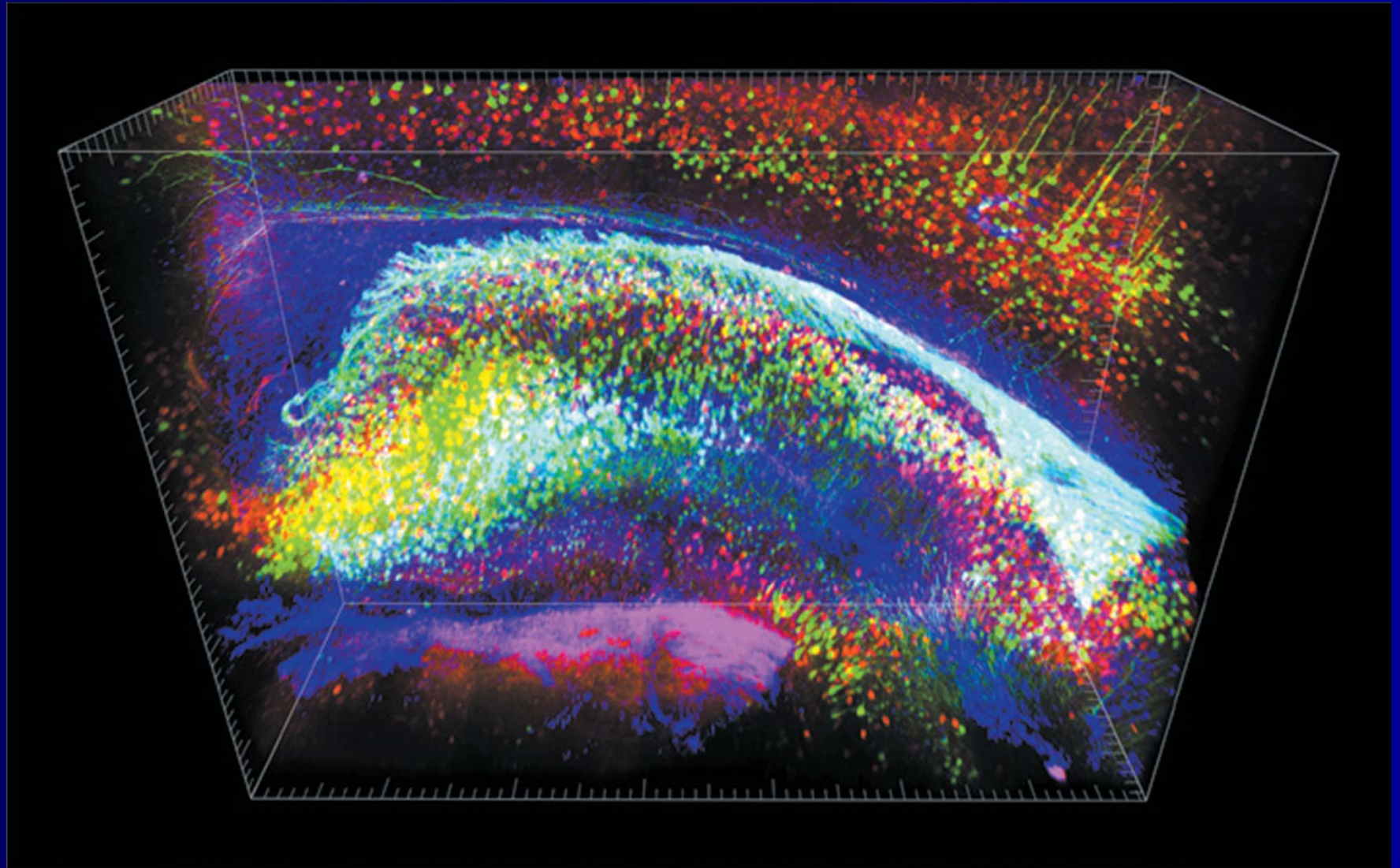
Synthetic memory trace



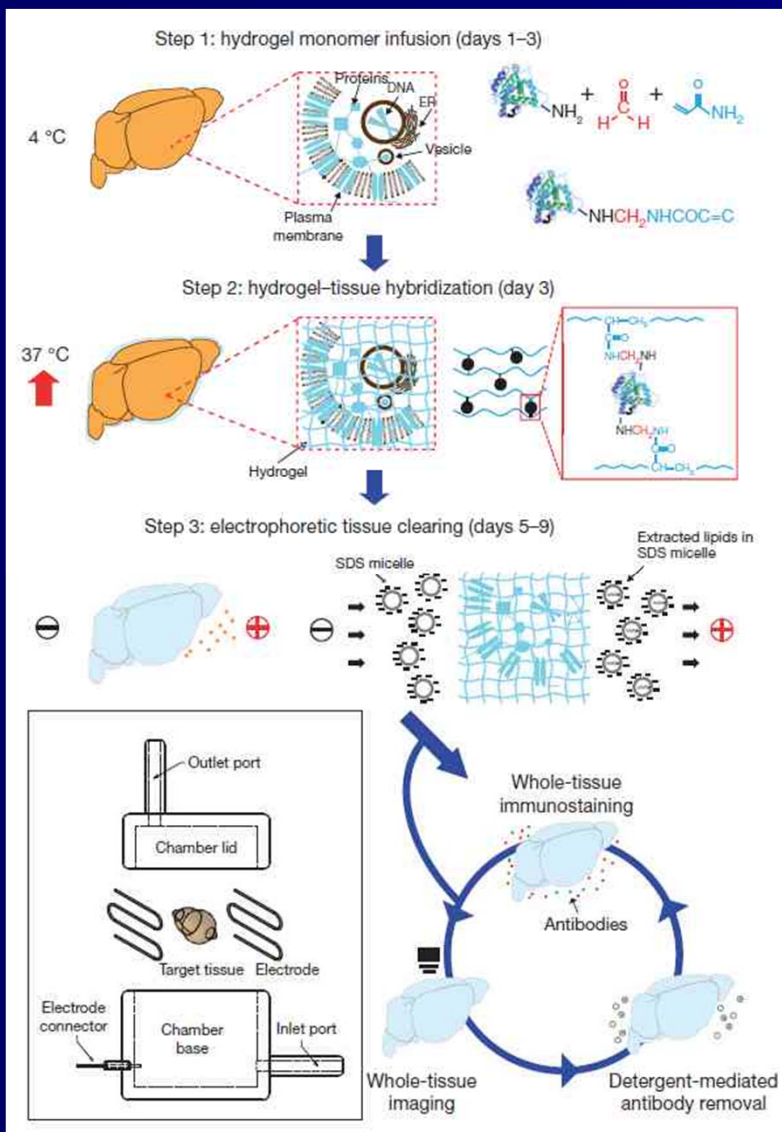
Pokročilé metody studia učení a paměti

- *Behaviorální techniky – viz výše*
- Elektrofyzologie – in vitro
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- Léze, funkční léze, genetické léze
- IEG Imaging
- Funkční zobrazování - fMRI, PET
- Optogenetika, chemogenetika
- **Clarity - zprůhledňování**

Clarity



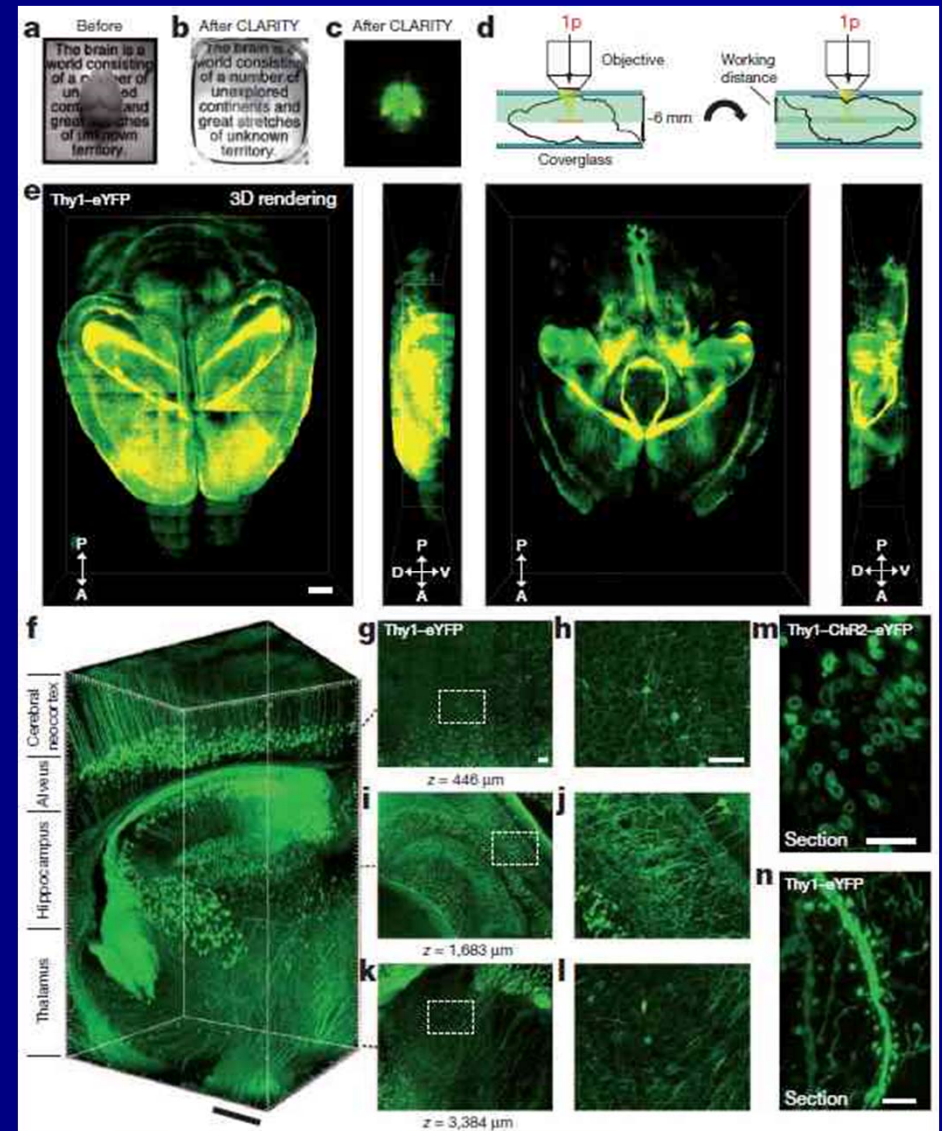
Clarity – „Odmašťovna“



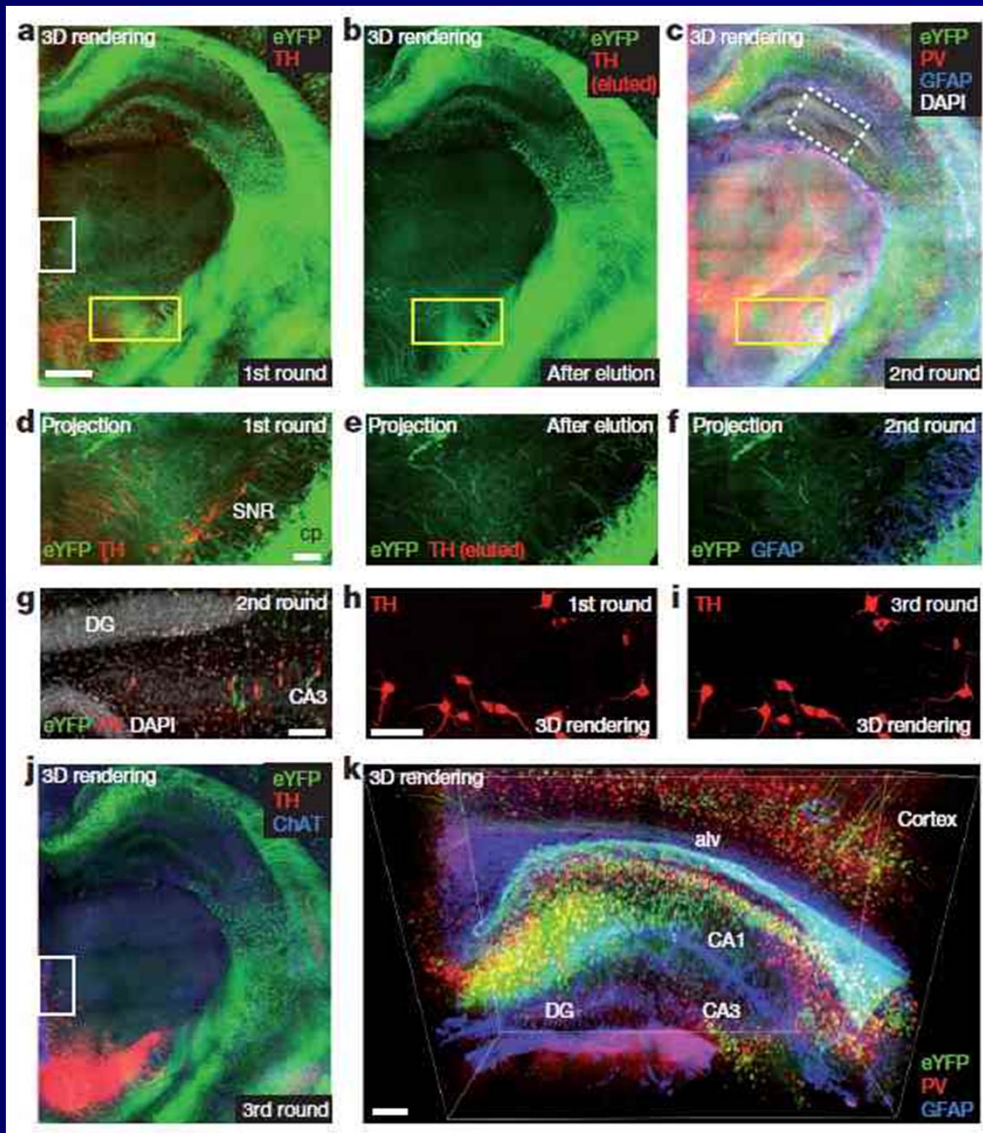
- Hlavní překážkou šíření světla tkání jsou lipidy.
- Jejich odstranění po předchozí fixaci hydrofilních biomolekul v hydrogelové mřížce zprostupňuje též tkáň/vzorek pro makromolekuly (protilátky apod.).

Clarity

- V závislosti na pracovní vzdálenosti objektivu lze zobrazovat celý intaktní myšší mozek.

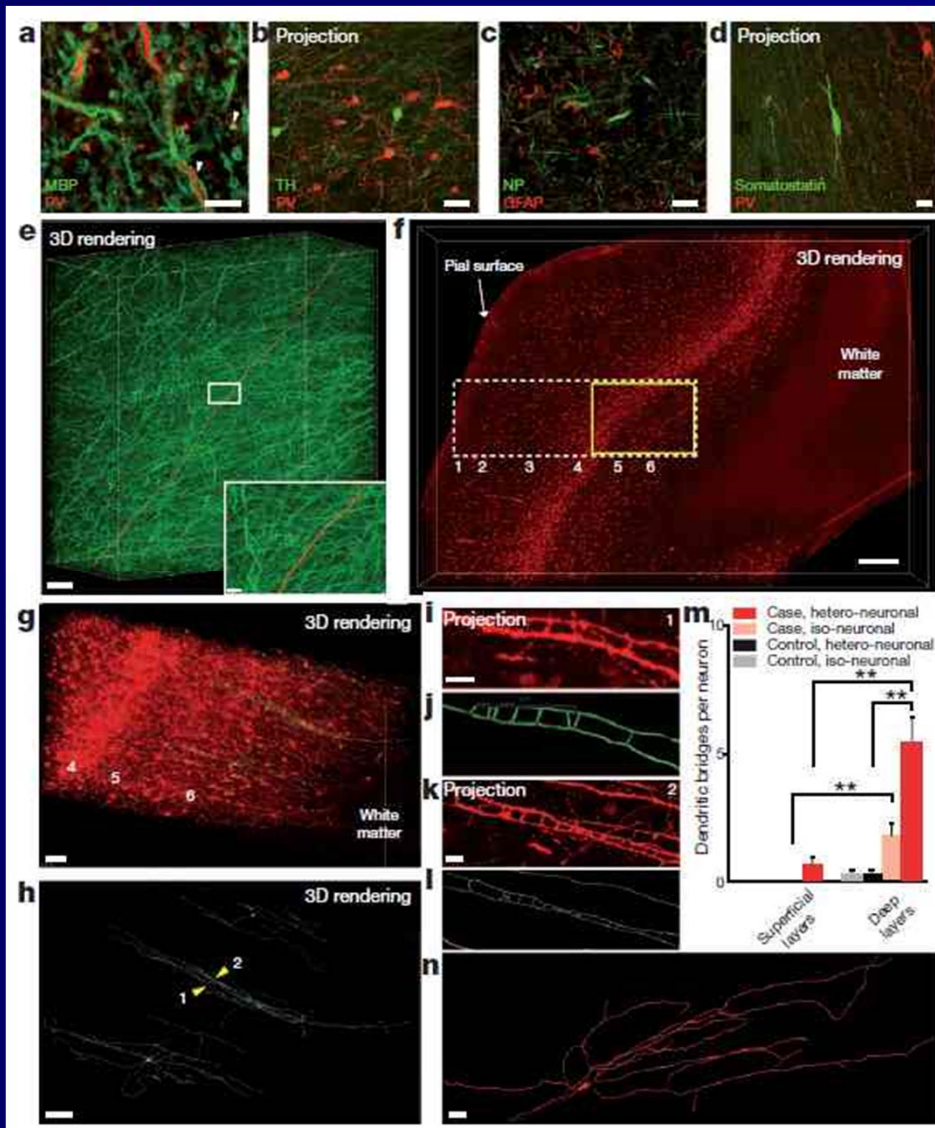


Clarity



- Clarity umožňuje opakované barvení – opravdu trvalý preparát

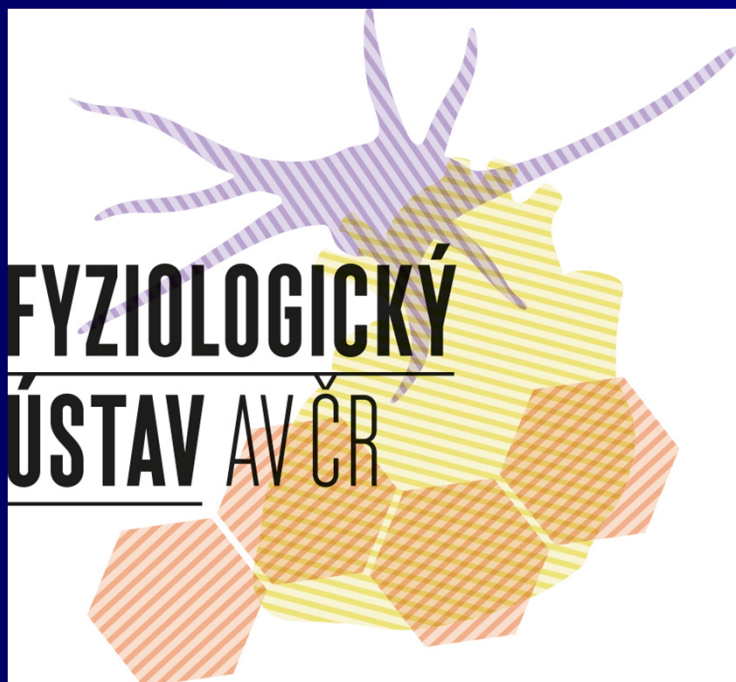
Clarity



- Kontinuita struktury – trasování projekcí v intaktní tkáni
- Zvýšené množství dendritických můstků v autismu.

Děkuji za pozornost!

Štěpán Kubík a Aleš Stuchlík



<http://www.fgu.cas.cz/>



<http://memory.fgu.cas.cz>