

Pokročilé techniky ve studiu učení a paměti

Pokroky v neurovědách

Aleš Stuchlík a Štěpán Kubík

Pokročilé metody studia učení a paměti

OBSAH:

Elektrofyzilogie

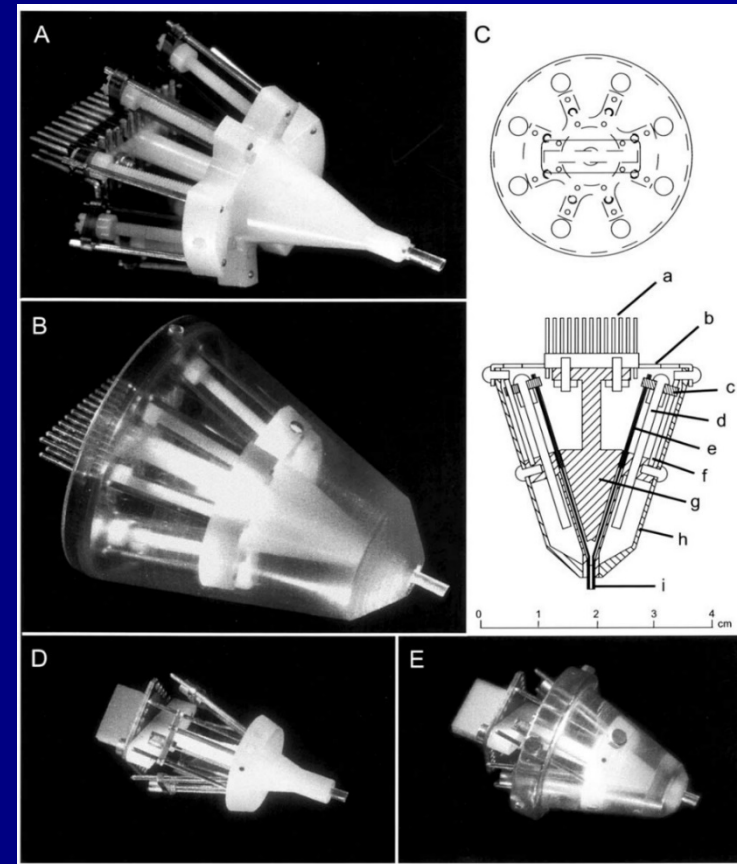
- Extracellular multiple single unit recording
- Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- Intervenční techniky
- IEG Imaging
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

Eletrofyzologie

- Multiple single unit recording
 - Hippocampal place cells – nejznámější příklad
 - Tetrody – 4 spojené elektrody s podobným signálem, umožňují
 - Klastrování
 - rozřídění multijednotkového záznamu na jednotlivé neurony porovnáním 4 signálů z tetrody
 - Firing rate maps
 - zprůměrovaná aktivita – ztráta časové osy
 - Time series
 - jednotlivé epizody – detailní časová informace
 - Neuronal ensembles (cell assemblies)
 - Množiny funkčně propojených neuronů vytvářejí paměťové reprezentace

Head-mount microdrives

- Jednotlivé elektrody jsou připojeny ke společnému konektoru.
- Jednotlivé tetrody jsou nezávisle pohyblivé pomocí šroubového posunu.
- Legenda: A. Potkaní microdrive pro 8 tetrod připojených ke konektoru Millmax B. Vybavený ochranným krytem C. Schema microdrivu D. Myší microdrive pro 4 tetrody připojené ke konektoru Omnetics.



Headstage connectors



- Headstage se připojuje k implantátu na hlavě zvířete.
- Zesiluje signál před vedením do hlavního zesilovače.
- Je vybaven diodami pro určení polohy a orientace zvířete.

Tetrodes & microdrives

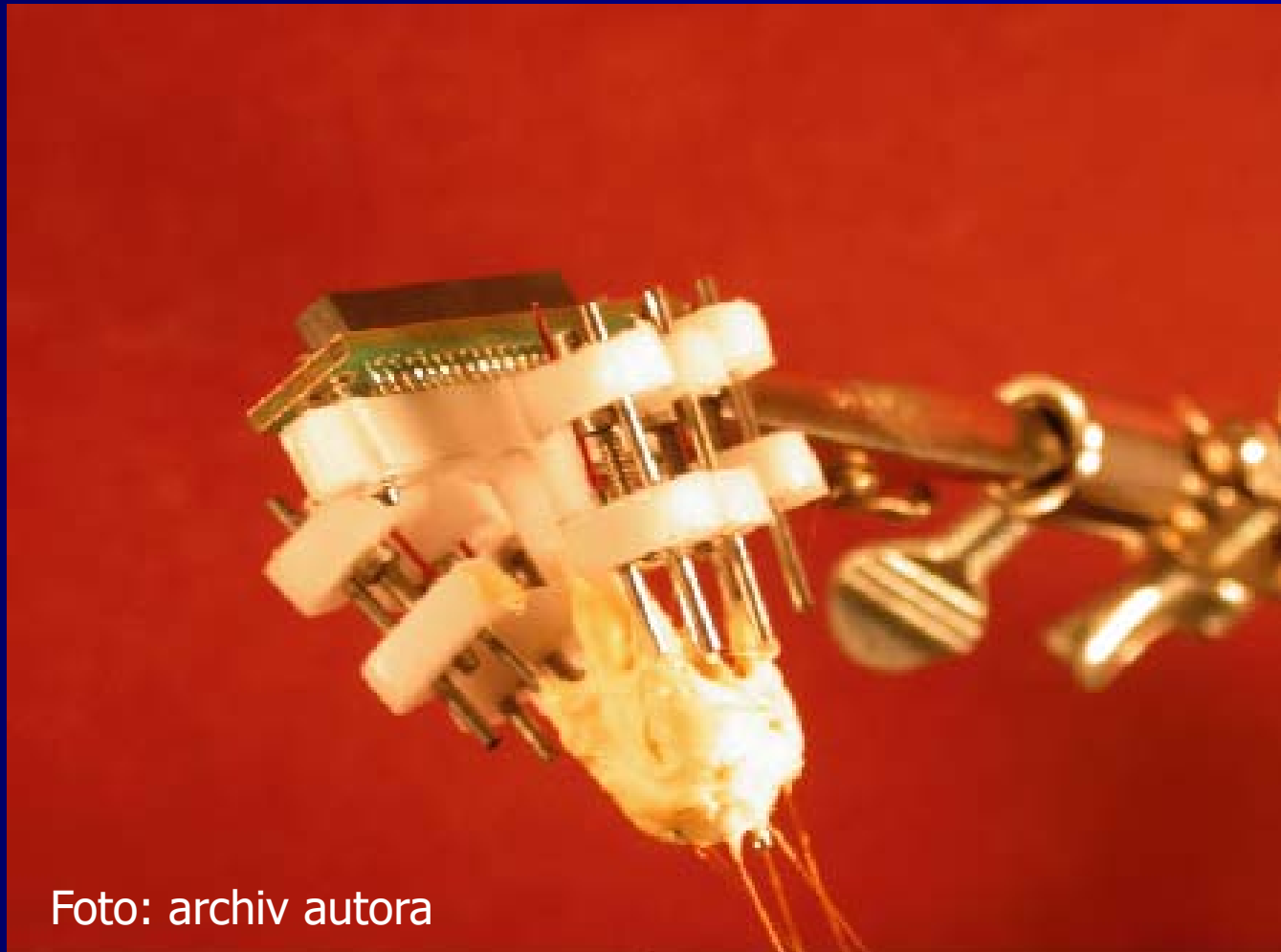


Foto: archiv autora

Tetrodes & microdrives

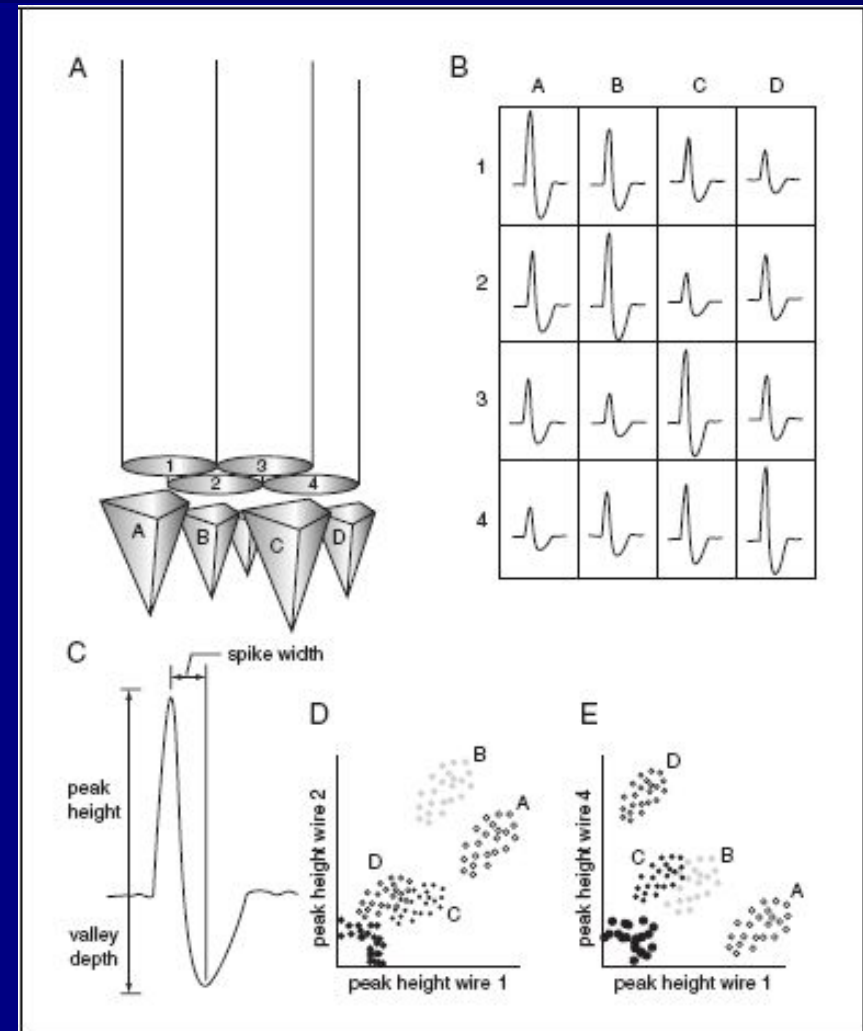


Foto: archiv autora

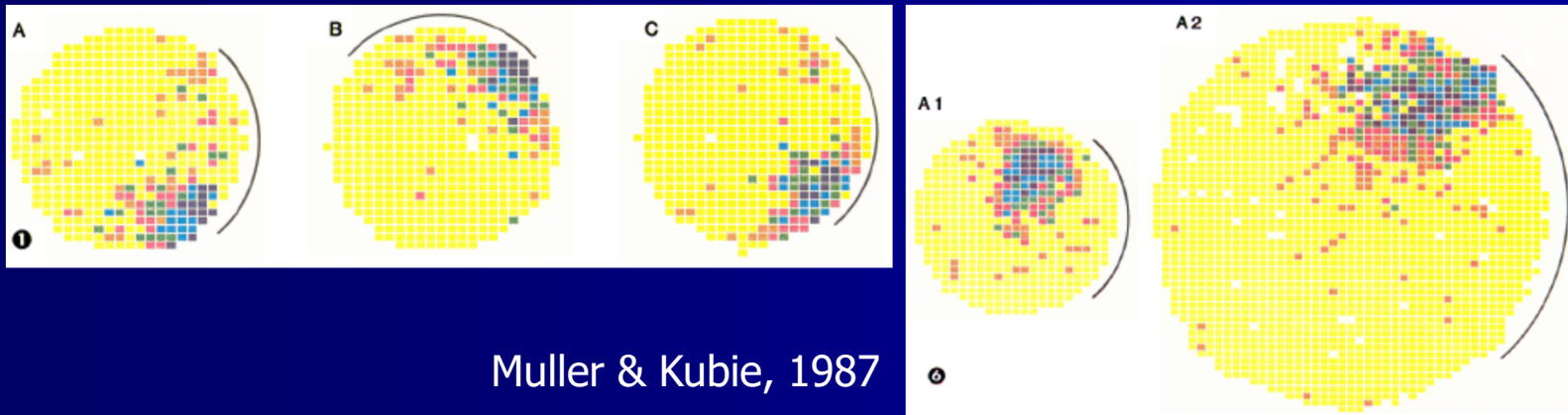
Multiunit recording

- A. 4 elektrody (12.5 - 25 μ m) jedné tetrody přenáší signál stejných neuronů, ale z různých perspektiv.
- B. Jednotlivé neurony se charakteristicky liší poměrem mezi jednotlivými elektrodami.
- C. Parametry výboje
- D., E. Vynesem parametrů výboje z různých elektrod proti sobě získáme shluky (clusters) výbojů odpovídající jednotlivým neuronům.

Szymusiak & Nitz, Curr Prot Neurosci
6.16, 2002



Firing rate maps a změny v prostředí



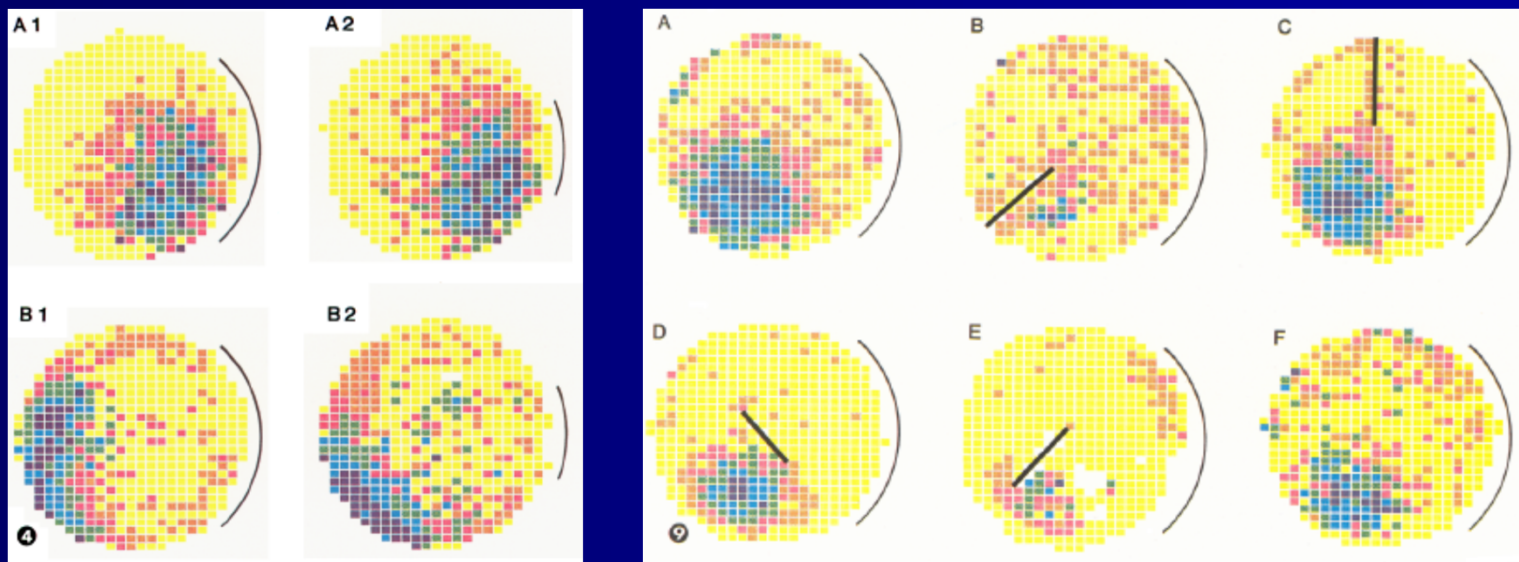
Muller & Kubie, 1987

- Aktivita place cells (místní neurony) vytváří v dlouhodobém (20-30 min) záznamu ohraničené shluky nazývané firing fields (FFs).
- V uniformním prostředí s jedinou orientační značkou (cue) následují FFs posun této značky (A-B-C).
- Při proporcionální změně prostředí si FF zachovávají svou relativní pozici vůči orientační značce (A1-A2).

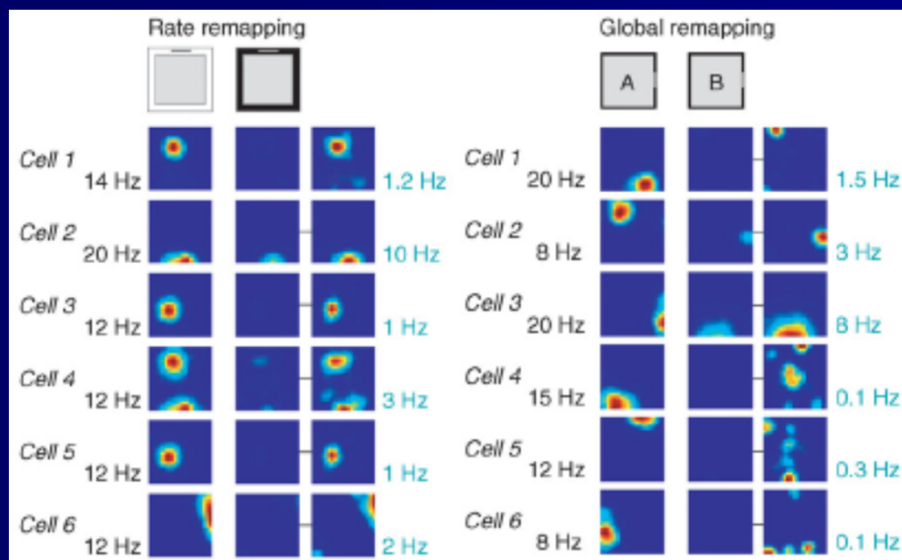
Firing rate maps a změny v prostředí

- Při zmenšení orientační značky FF sledují obvykle jeden z jejích okrajů (A1-A2, B1-B2).
- Instalace bariéry reverzibilně naruší FFs v jejím okolí (B, E).

Muller & Kubie, 1987



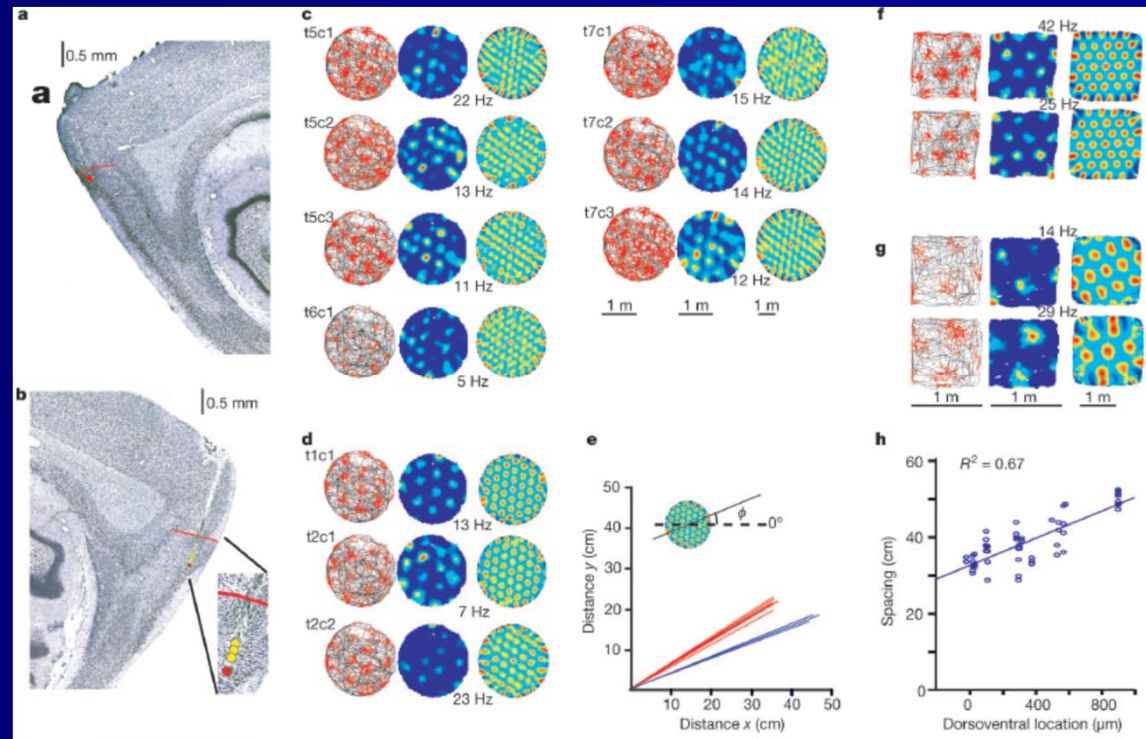
Remapping



- Na změny v prostředí reagují place cells dvěma způsoby:
- Rate remapping, kdy se mění intenzita aktivity, ale ne její lokace a
- Global remapping, kdy dochází ke změně celé reprezentace, včetně identity aktivních neuronů a polohy jejich FFs.

Entorhinal grid cells

- V entorinální kůře potkanů se vyskytují grid cells, jejichž aktivita vytváří „mřížku“ pravidelně uspořádaných bodů.
- Měřítko této mřížky se systematicky mění dle dorsoventrální osy.
- Neurony v této oblasti reagují také na přítomnost bariér či okrajů, orientaci hlavy, a rychlost pohybu.



Hafting et al., Nature, 2005

Pokročilé metody studia učení a paměti

- Elektrofyzologie
 - Extracellular multiple single unit recording
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- **Intervenční techniky**
- IEG Imaging
- 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 antagonisty 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 – včetně zárodečných linií
 - Selective
 - Cre recombinase a loxP system – vyštěpí nebo obrátí sekvenci sevřenou loxP tagy v závislosti na jejich orientaci.
 - cell type-specific promoters – CaMKII, GFAP, PV, ...
 - Inducible
 - Tet-O system (tetracycline transactivator)

Pokročilé metody studia učení a paměti

- Elektrofyzologie
 - Extracellular multiple single unit recording
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- Intervenční techniky
- **IEG Imaging**
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

IEG imaging

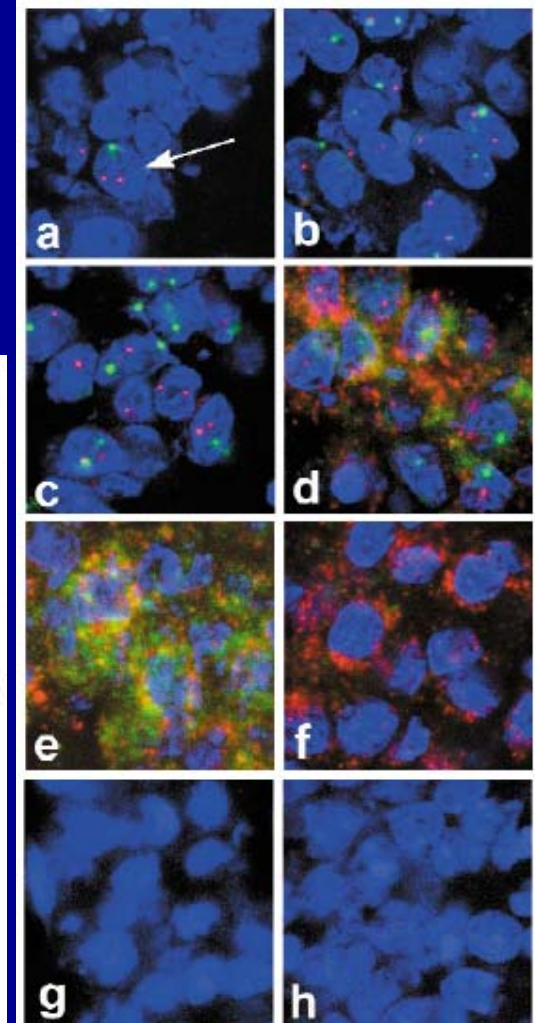
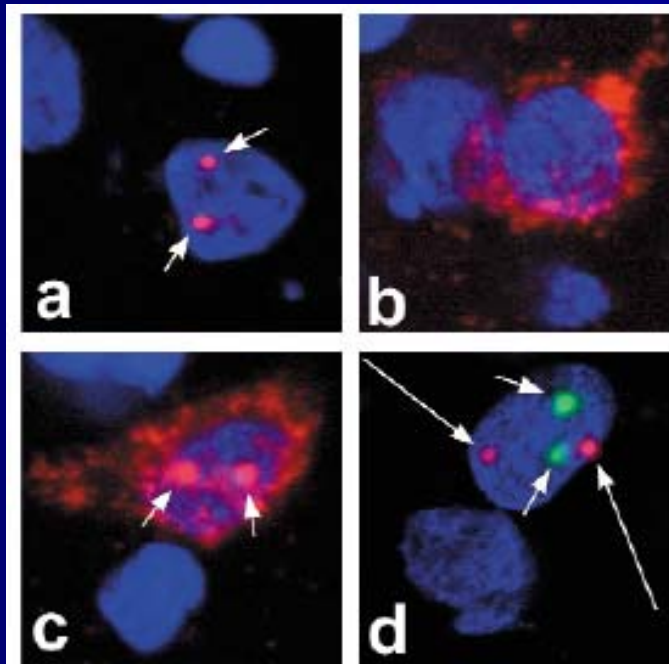
- Nervová aktivita spouští expresi genů časně odpovědi (immediate-early genes – IEGs) v neuronech
 - C-fos, Zif268/Egr 1/..., Narp, BDNF, **Arc**, **Homer1a**
- RNA
 - in situ hybridization
 - Radioaktivní
 - **Fluorescenční - FISH**
 - qPCR
 - Northern blot
- Protein
 - Immunohistochemistry
 - Western 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

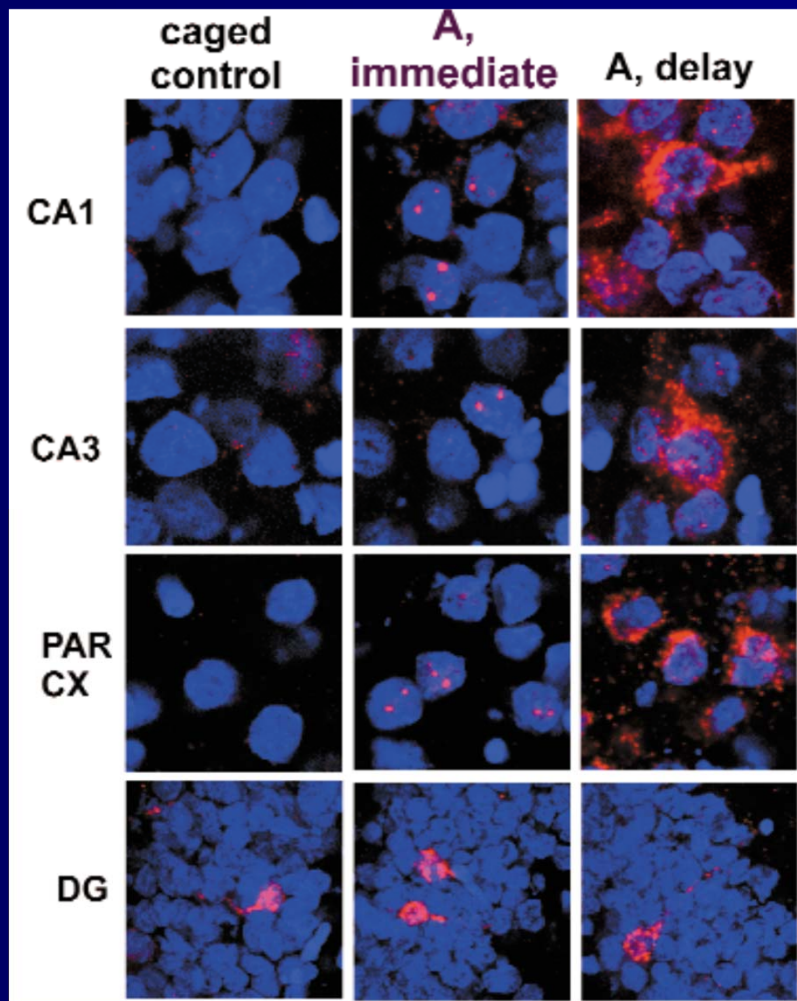
Různé druhy IEG signálu: *Arc*
Intranuclear foci
-INF (a); *Arc* -
cytoplasmic (b);
double-positive
Arc signal (c);
double label *Arc*
(zeleně) a *zif268*
(červeně)(d)

Guzowski et al., 1999



catFISH

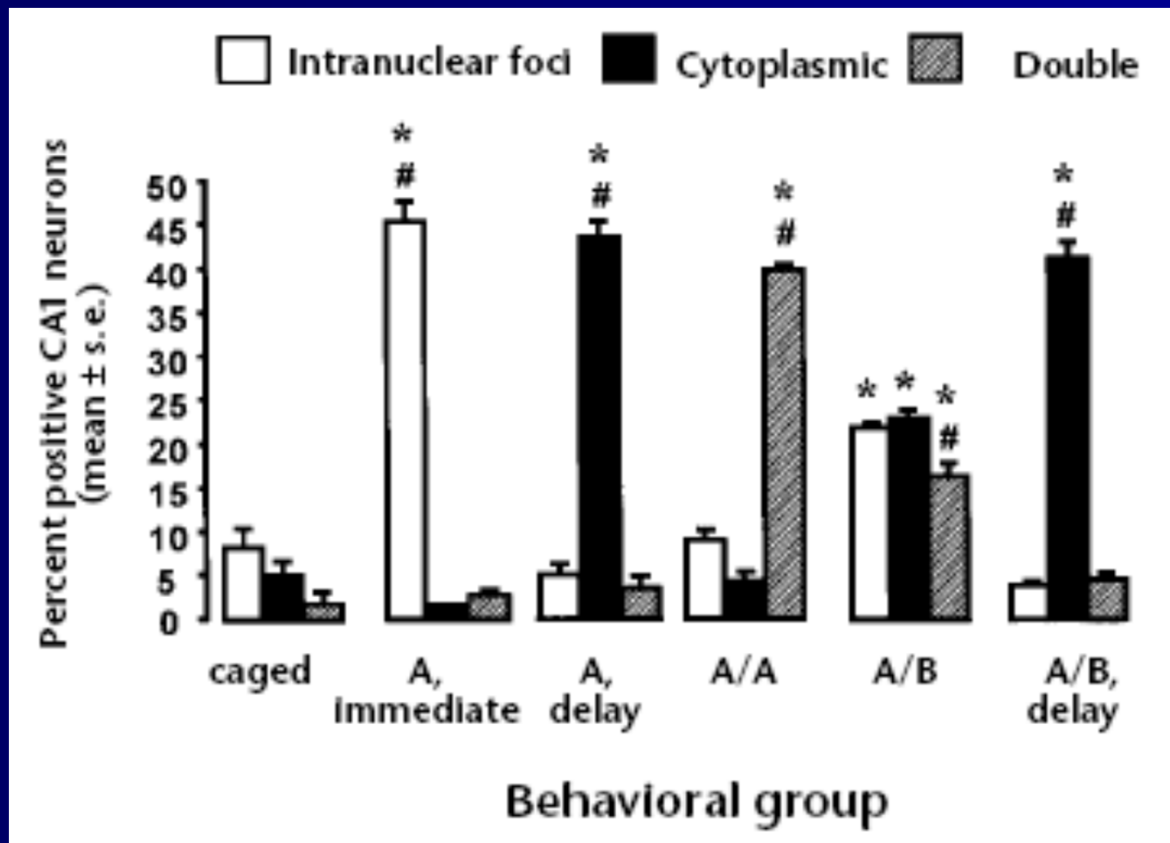
Cellular compartment analysis of temporal activity by FISH



- 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

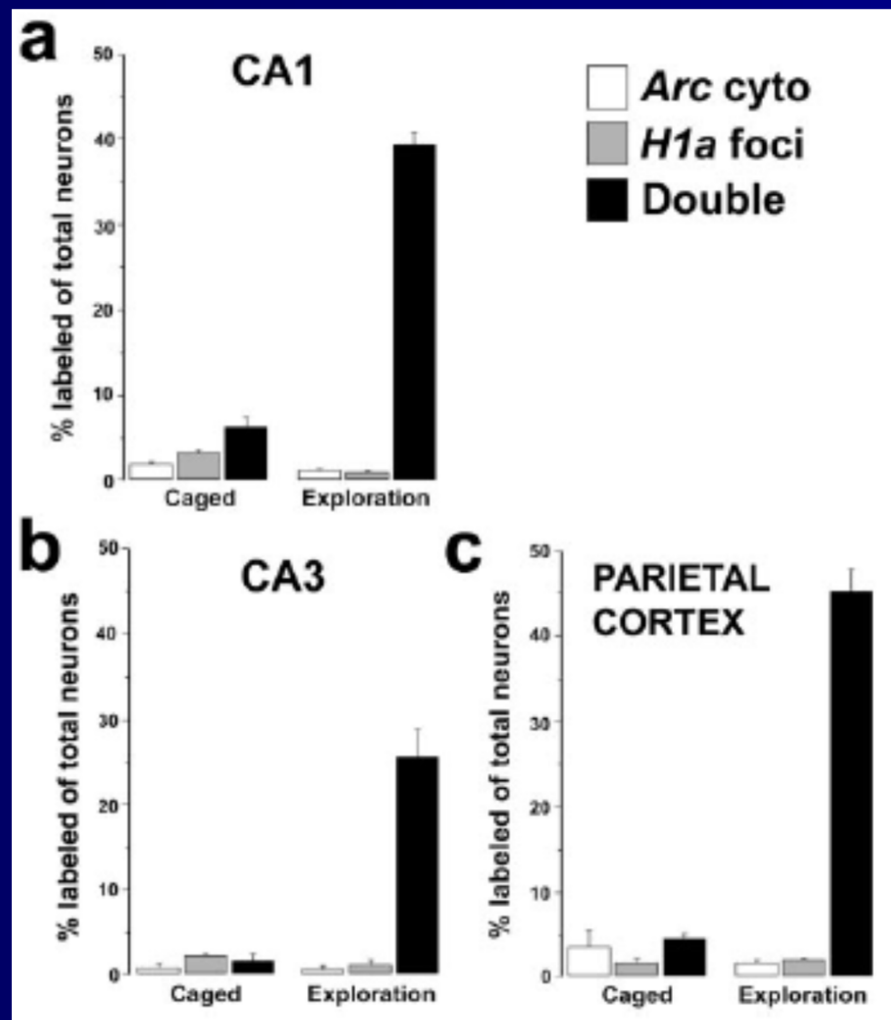
Kontextuální specifická exprese *Arc*



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.

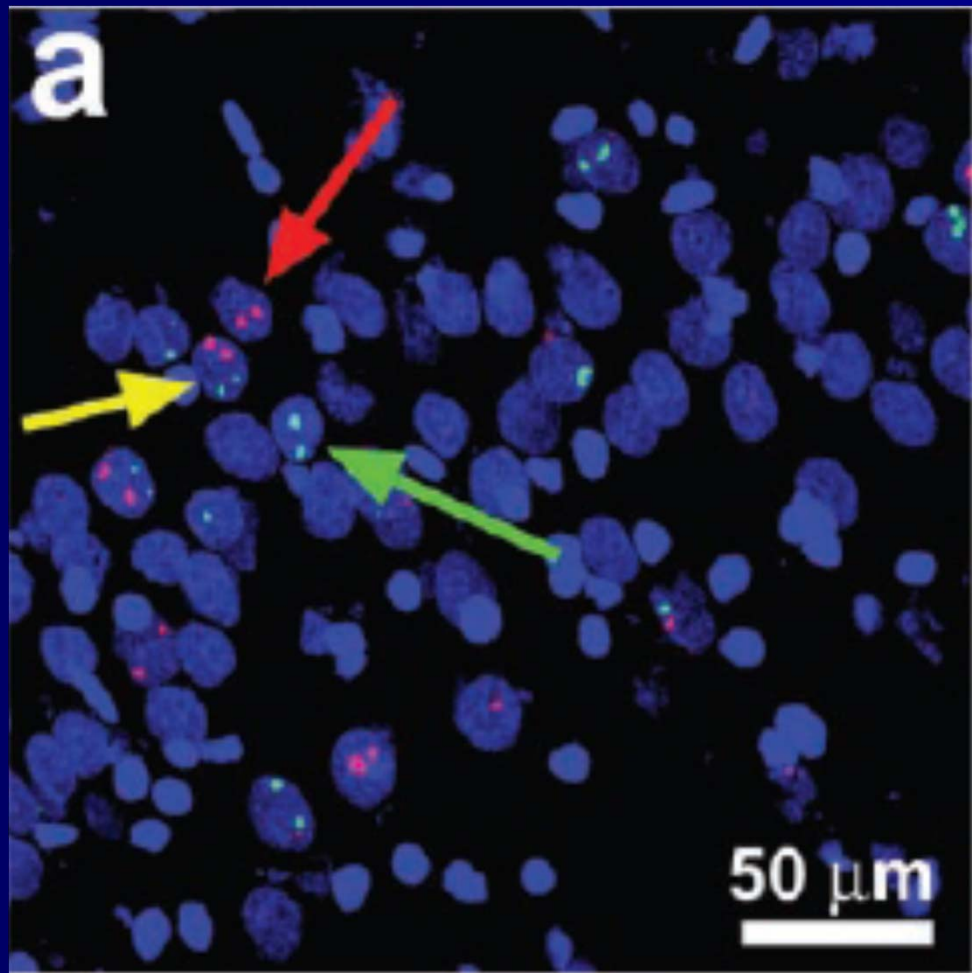
INF *H1a* kolokalizuje s cytoplazmatickým *Arc*



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

Vazdarjanova et al., 2002, J Neurosci

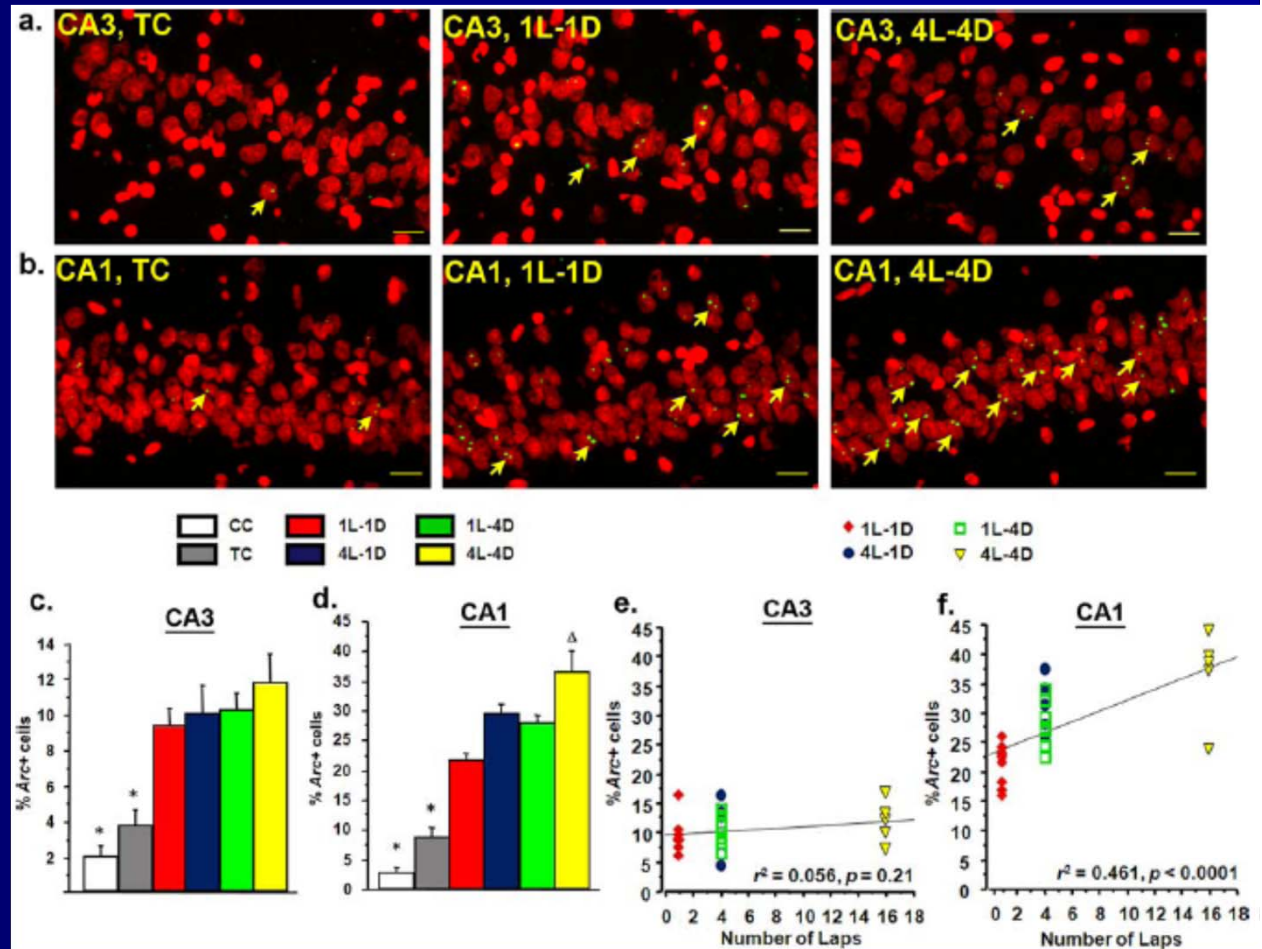
Arc/Homer1a catFISH



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.

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.



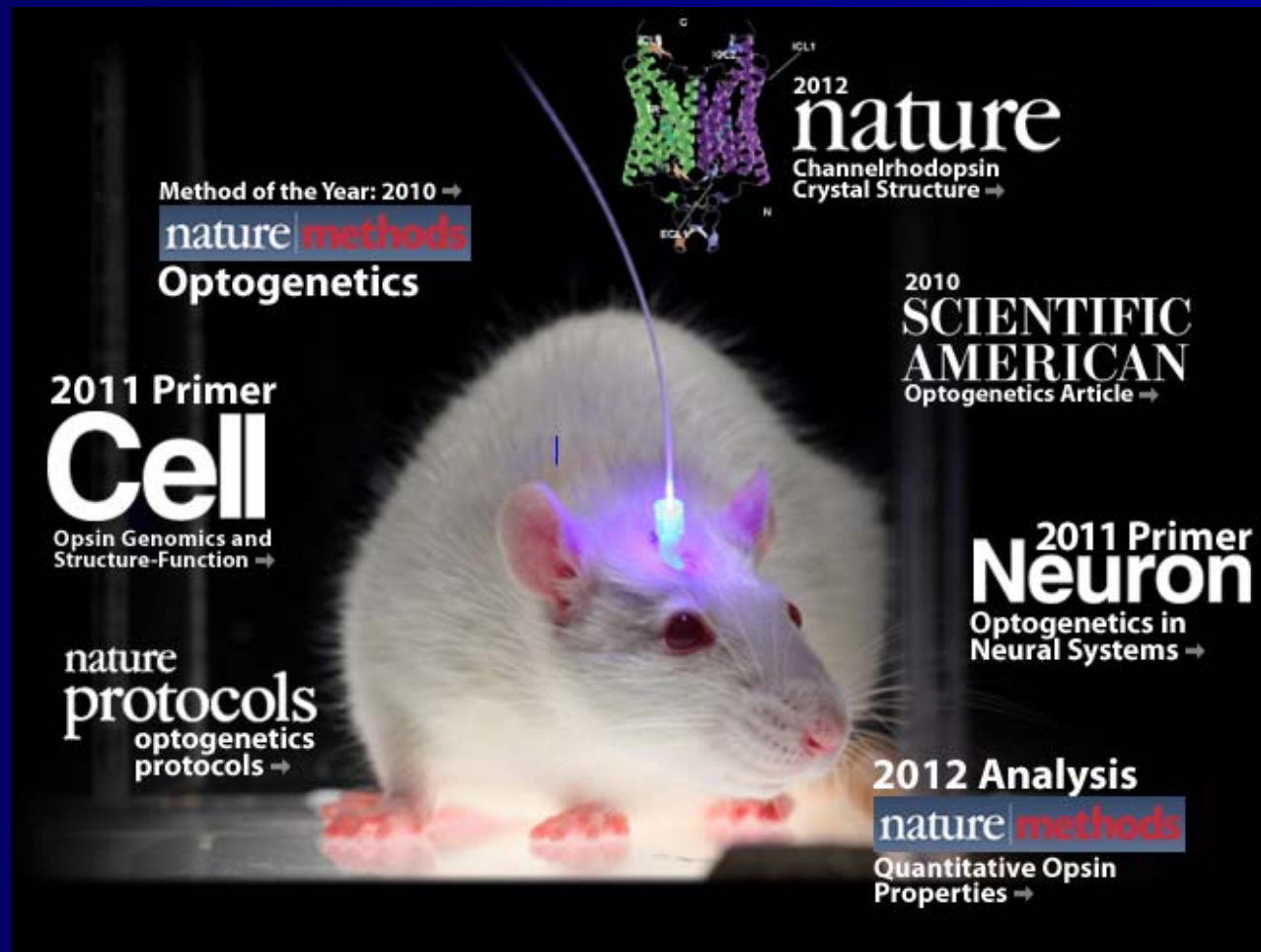
Pokročilé metody studia učení a paměti

- **Elektrofyzologie**
 - Extracellular multiple single unit recording
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- **Intervenční techniky**
- **IEG Imaging**
- **Optogenetika, chemogenetika**
- **Clarity - zprůhledňování**

Optogenetika

Stanford Optogenetics Resource Center:

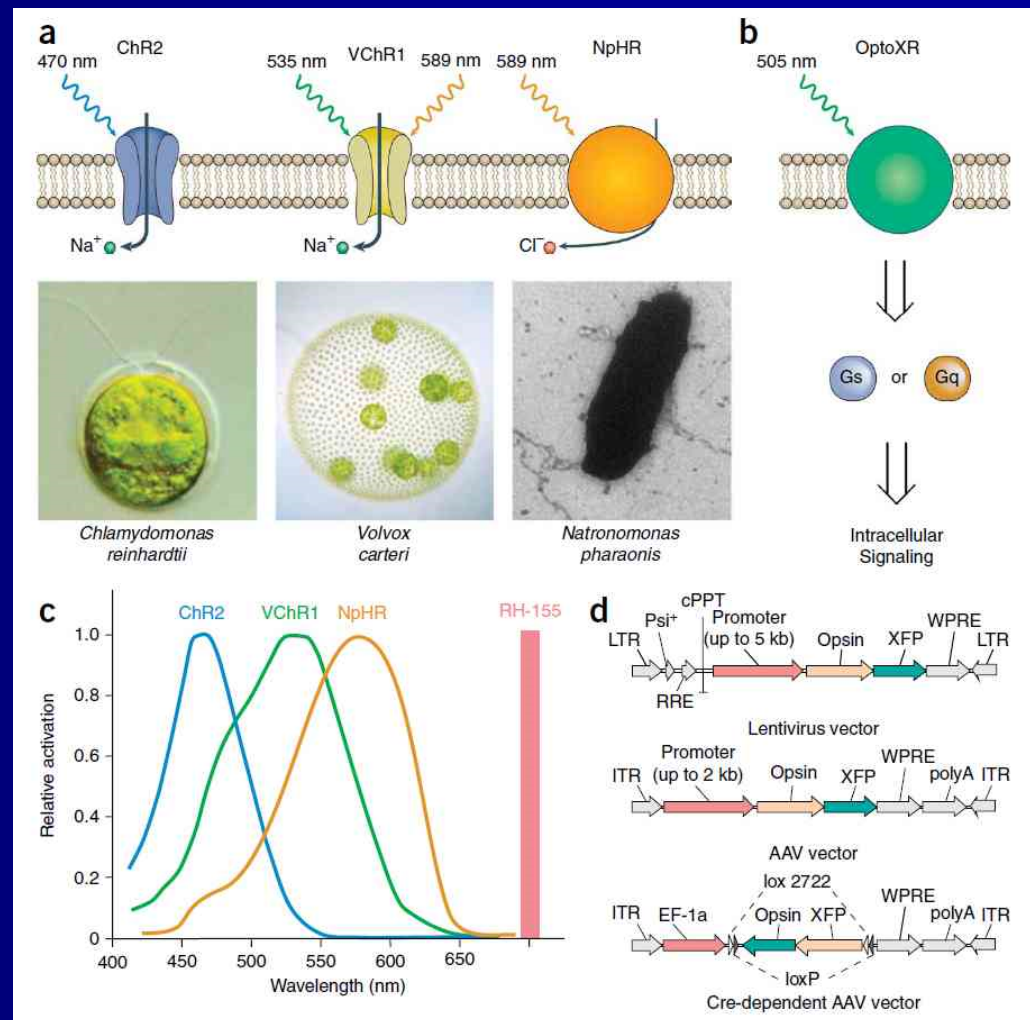
<http://www.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/>



Optogenetika

- Využívá fotosensitivní pigmenty mořských řas ke kontrole neuronální aktivity.
- Tyto mohou mít povahu kationtového kanálu, chloridové pumpy, nebo být spřažené s G-proteiny a pokrývají různé vlnové délky.
- Geny pro tyto opsiny se vnesou do cílových buněk pomocí virových nosičů zpravidla společně s fluorescenčním indikátorem, případně s dalšími systémy (Cre/loxP, tTA/tetO)

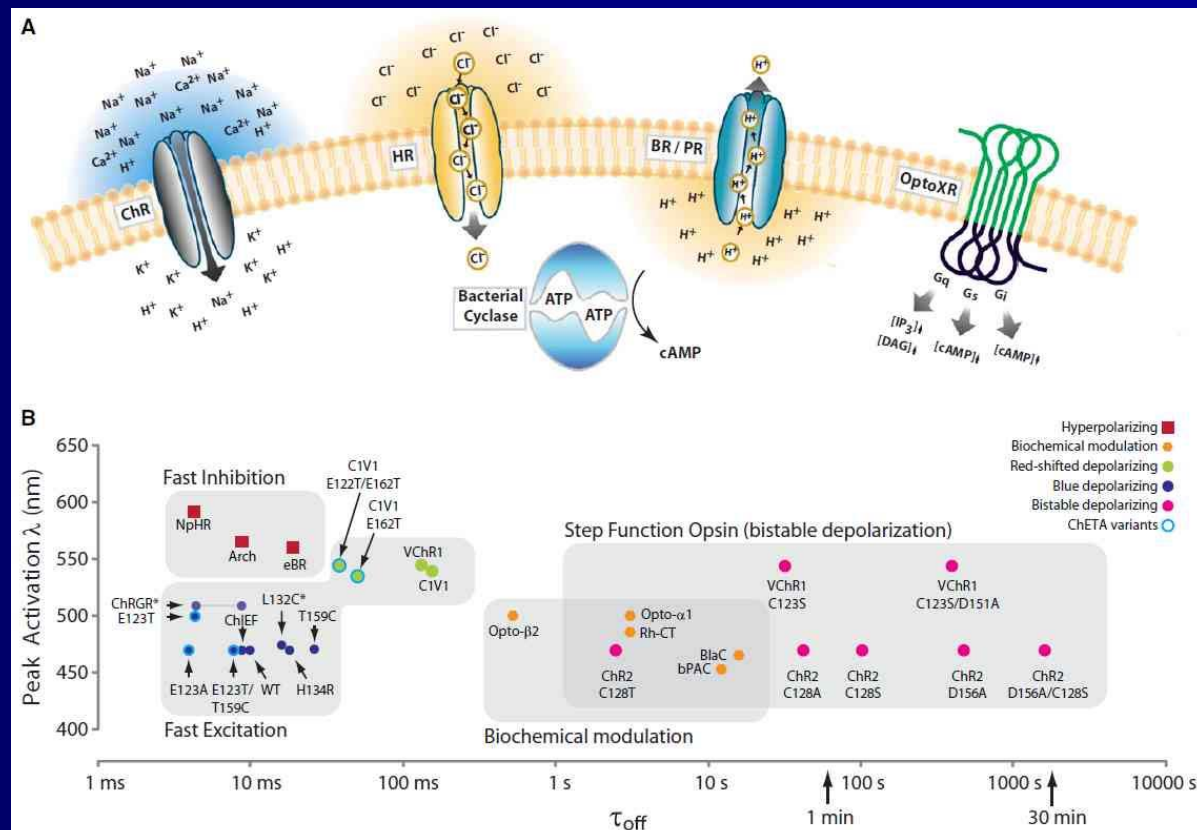
Zhang et al., 2010, Nature Prot



Opsiny

Yizhar et al., 2011, Neuron

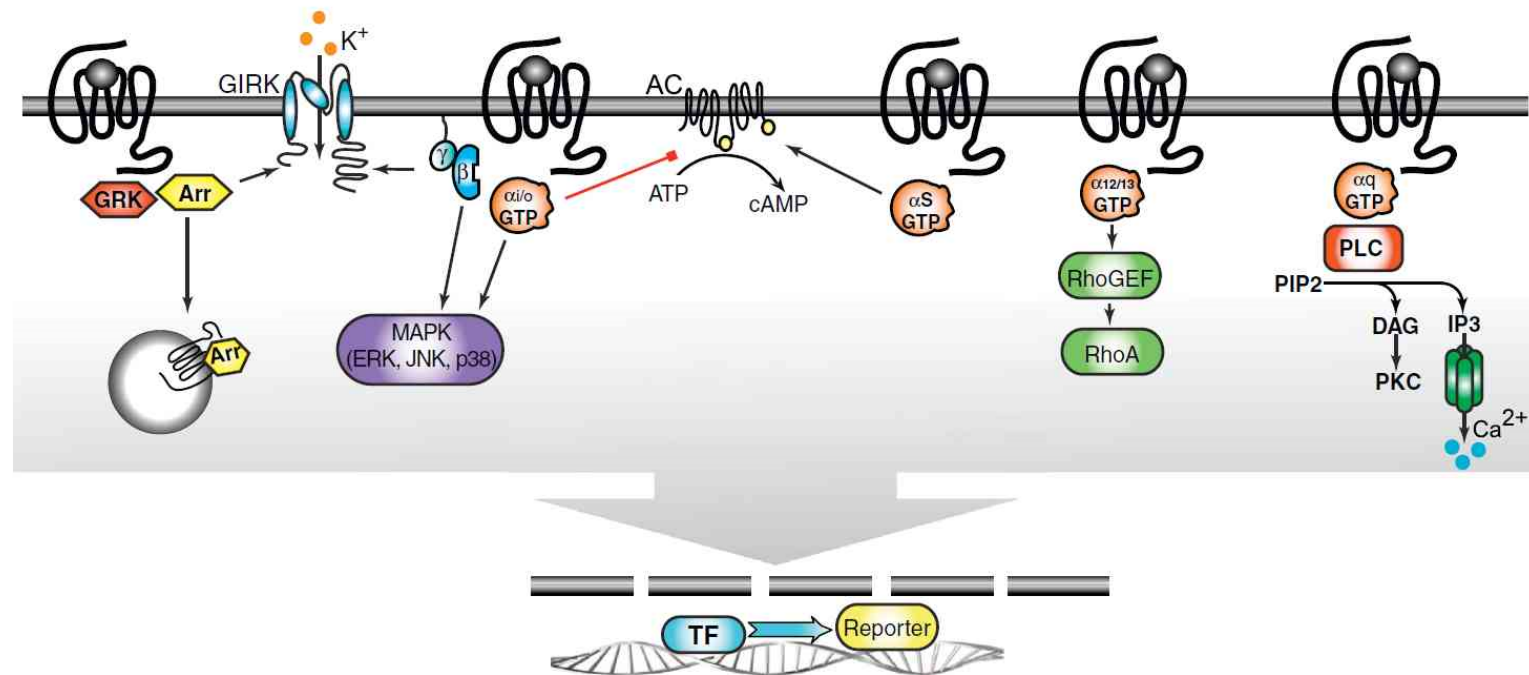
- Cílenými modifikacemi opsinů lze ovlivnit vlnovou délku, účinnost i časovou dynamiku



Chemogenetika - GPCR

G-protein-coupled receptors

Lee et al., 2013, Drug Discov Today



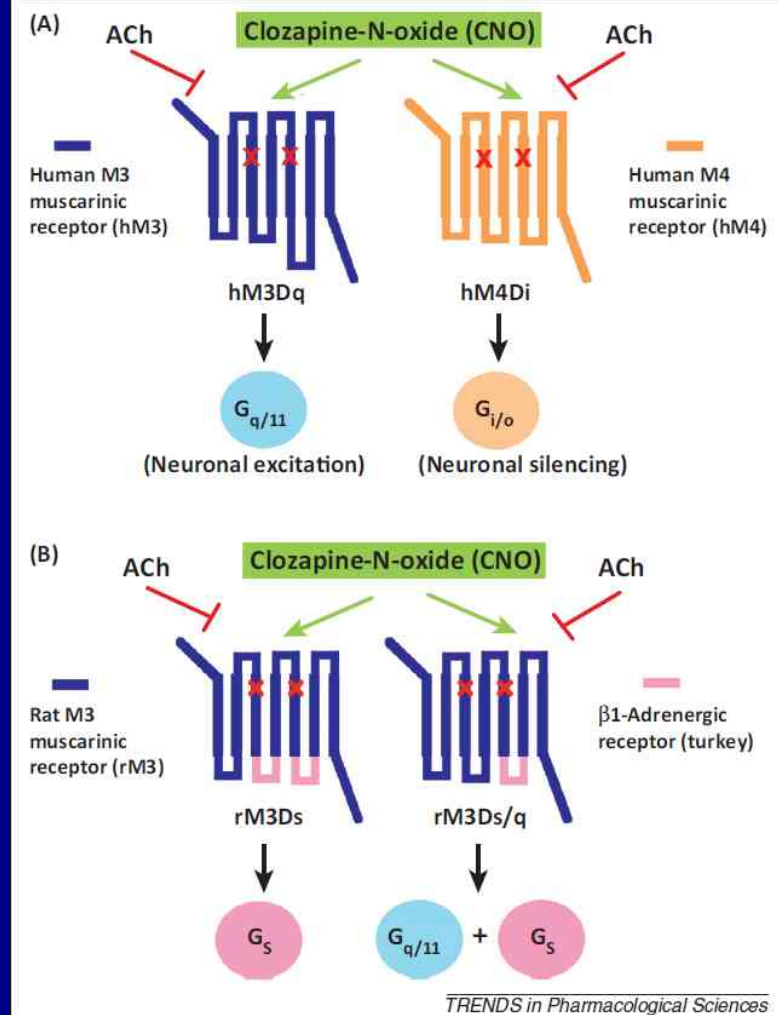
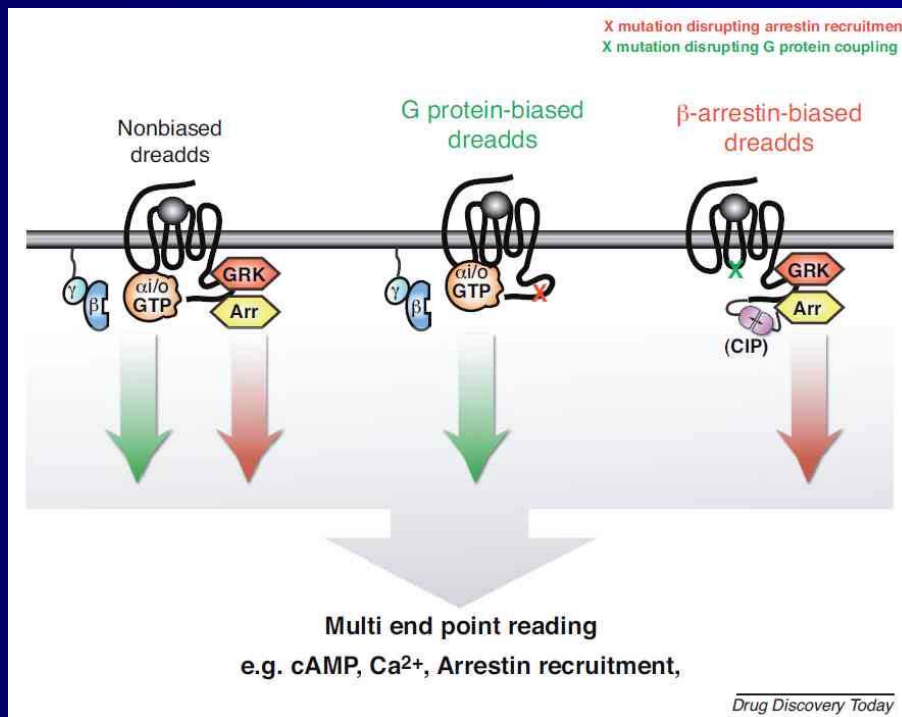
Drug Discovery Today

Neuronální aktivita může být ovládána také chemicky, pomocí designových (umělých) receptorů spojených s různými G-proteiny.

DREADDs

Wess et al., 2013, Trends Pharm Sci

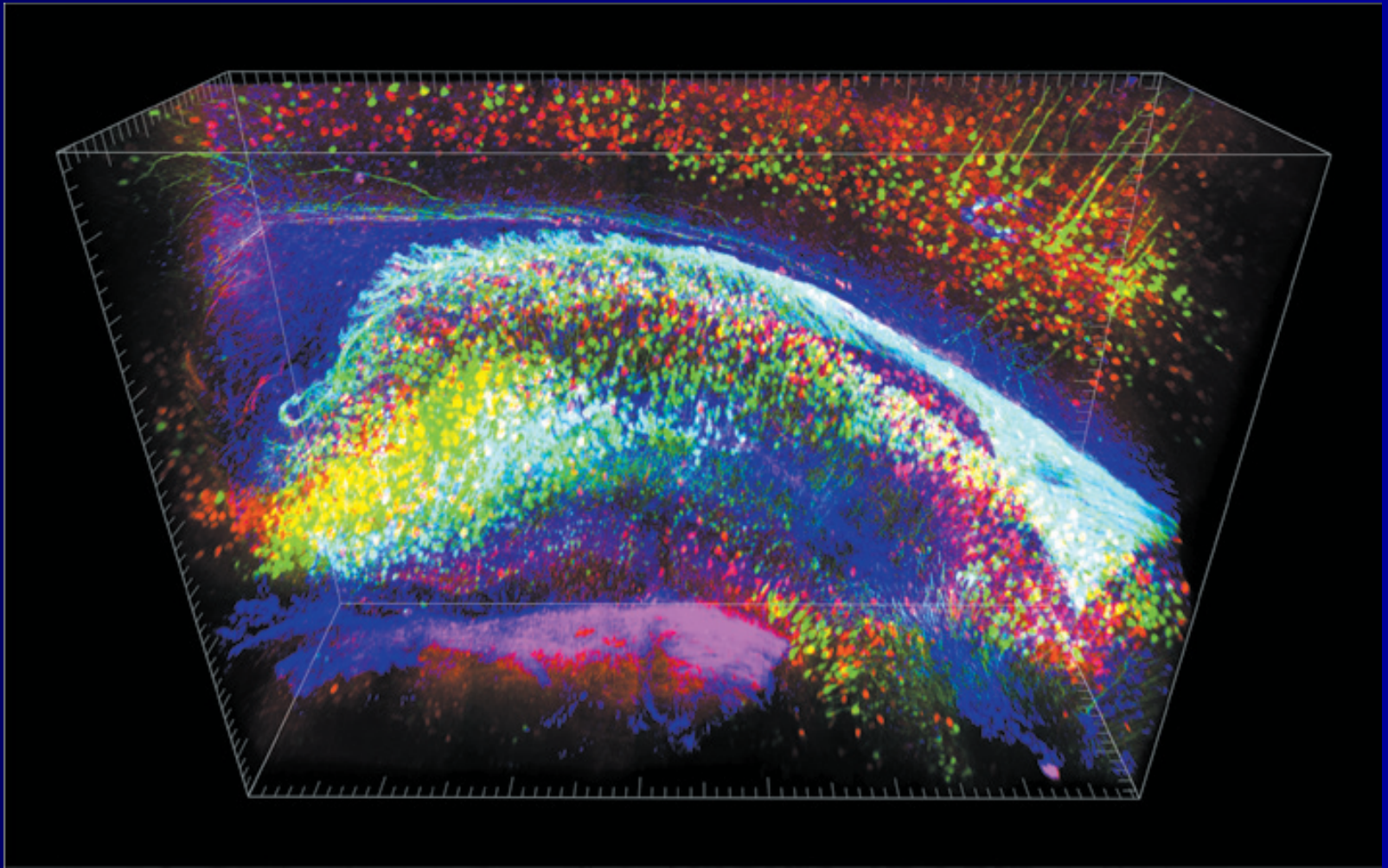
Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs CNO (Clozapine-N-Oxide)



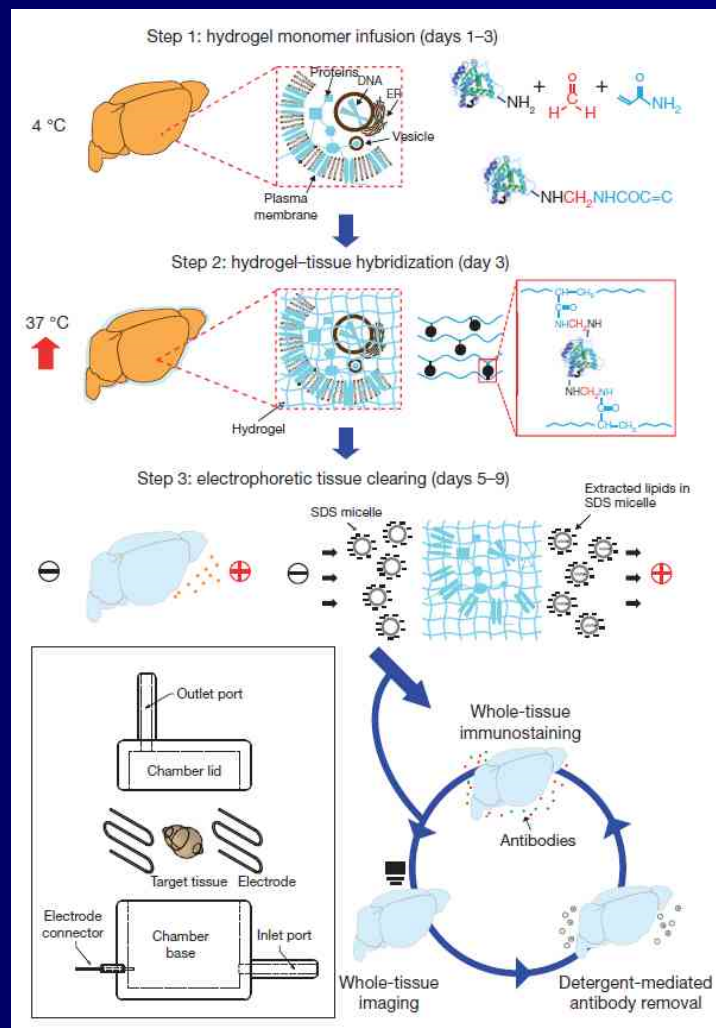
Pokročilé metody studia učení a paměti

- Elektrofyzologie
 - Extracellular multiple single unit recording
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- Intervenční techniky
- IEG Imaging
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

Clarity



Clarity

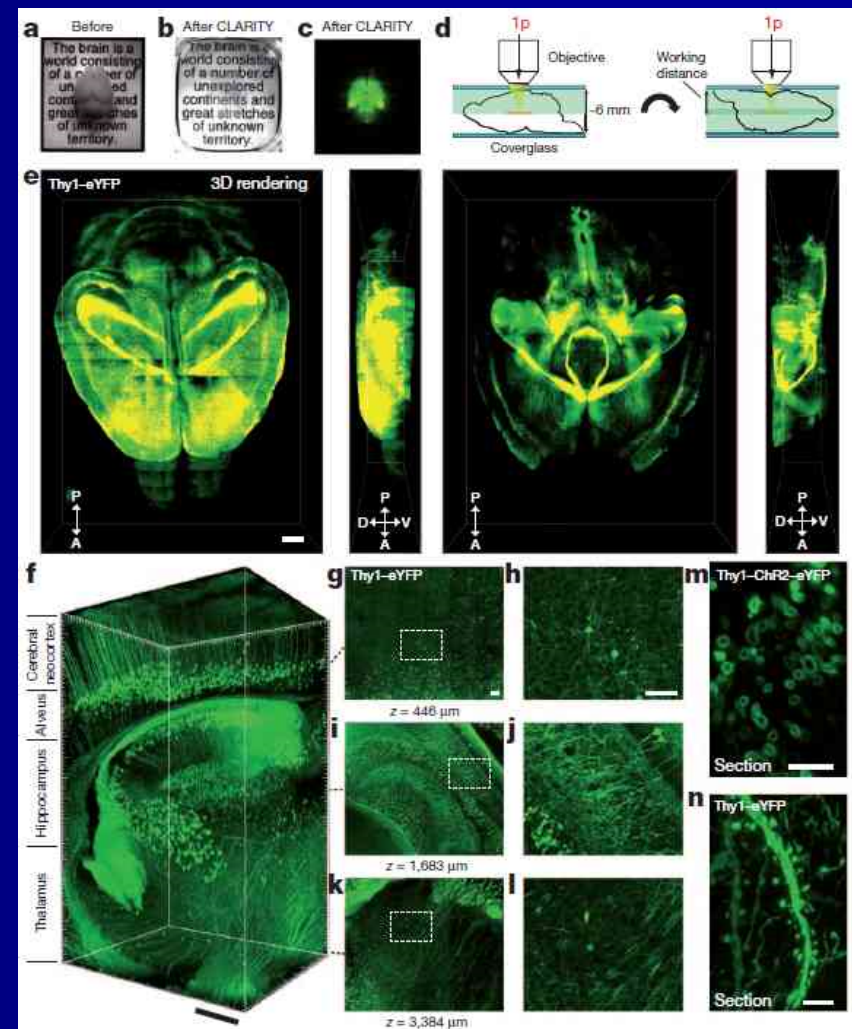


- Hlavní překážkou šíření světla tkání jsou lipidy.
- Jejich odstranění po předchozí fixaci hydrofilních biomolekul v hydrogelové mřížce zprostupňuje též tkáň/vzorek pro makromolekuly (protilátky apod.).

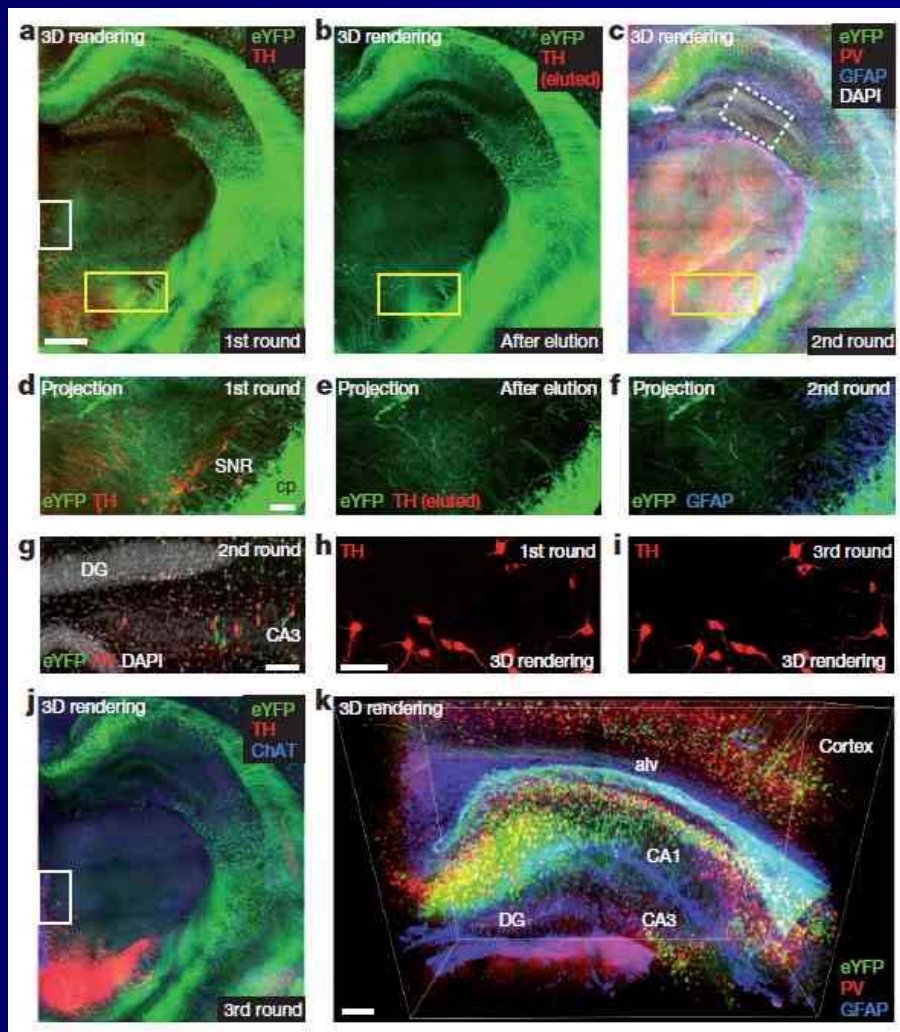
Cheng et al., 2013, Nature

Clarity

- Přes zprůhledněný myší mozek se dá číst (a-b).
- V závislosti na pracovní vzdálenosti objektivu lze zobrazovat celý intaktní myší mozek.

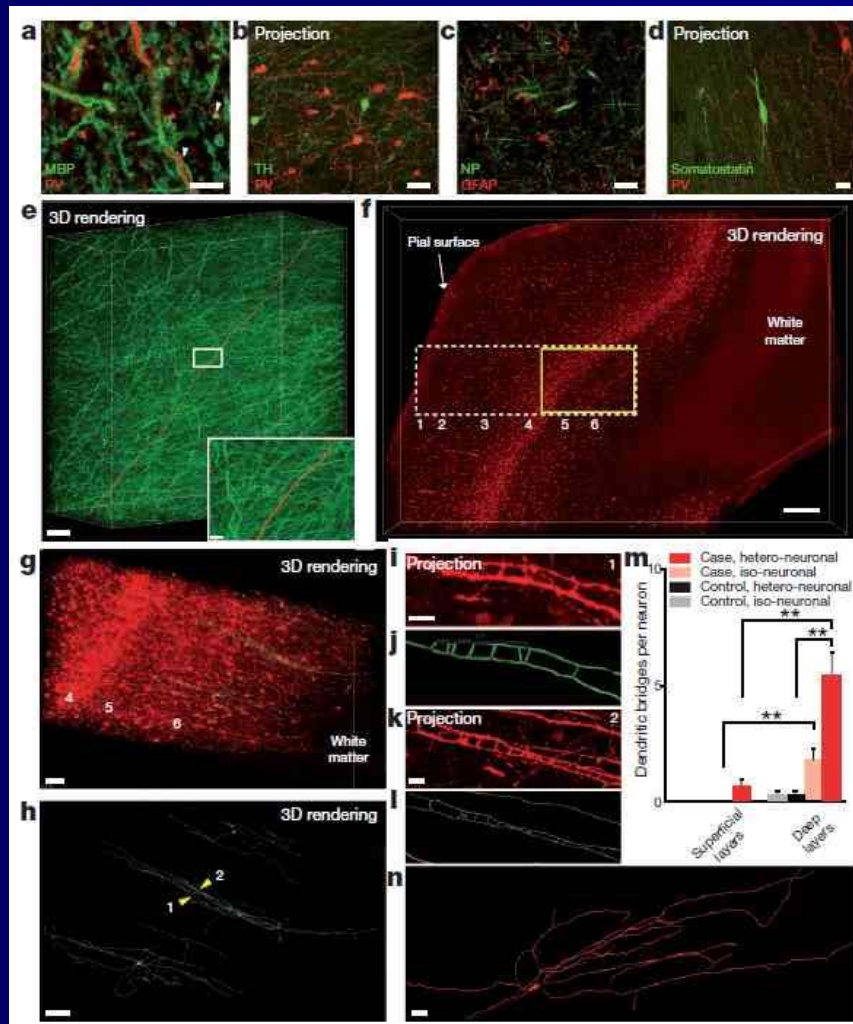


Clarity



- Clarity umožňuje opakované barvení – skutečně trvalý preparát

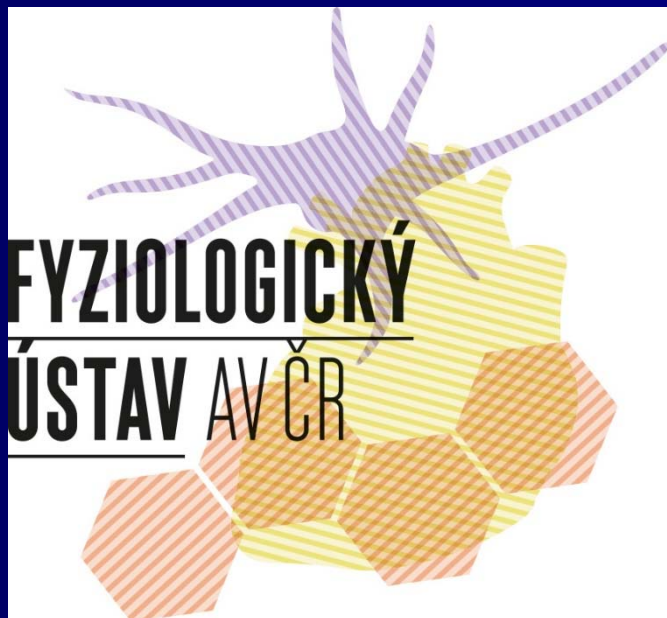
Clarity



- Kontinuita struktury – trasování projekcí v intaktní tkáni
- Zvýšené množství dendritických můstků v autismu
- Nebylo by možné konvenčními histologickými metodami

Děkuji za pozornost!

Štěpán Kubík a Aleš Stuchlík



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



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