

The background is a dark blue gradient with a starry texture. It features several white circular elements: a large scale on the left with numbers from 160 to 260, and several smaller circles with arrows indicating clockwise or counter-clockwise rotation. The main title is centered in large, bold, white capital letters.

POKROČILÉ TECHNIKY VE STUDIU UČENÍ A PAMĚTI

KOGNITIVNÍ NEUROBIOLOGIE
ALEŠ STUHLÍK & ŠTĚPÁN KUBÍK
LETNÍ SEMESTR 2022

OPAKOVÁNÍ

HIPOKAMPUS – MEKKA NEUROVĚDCŮ

- 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

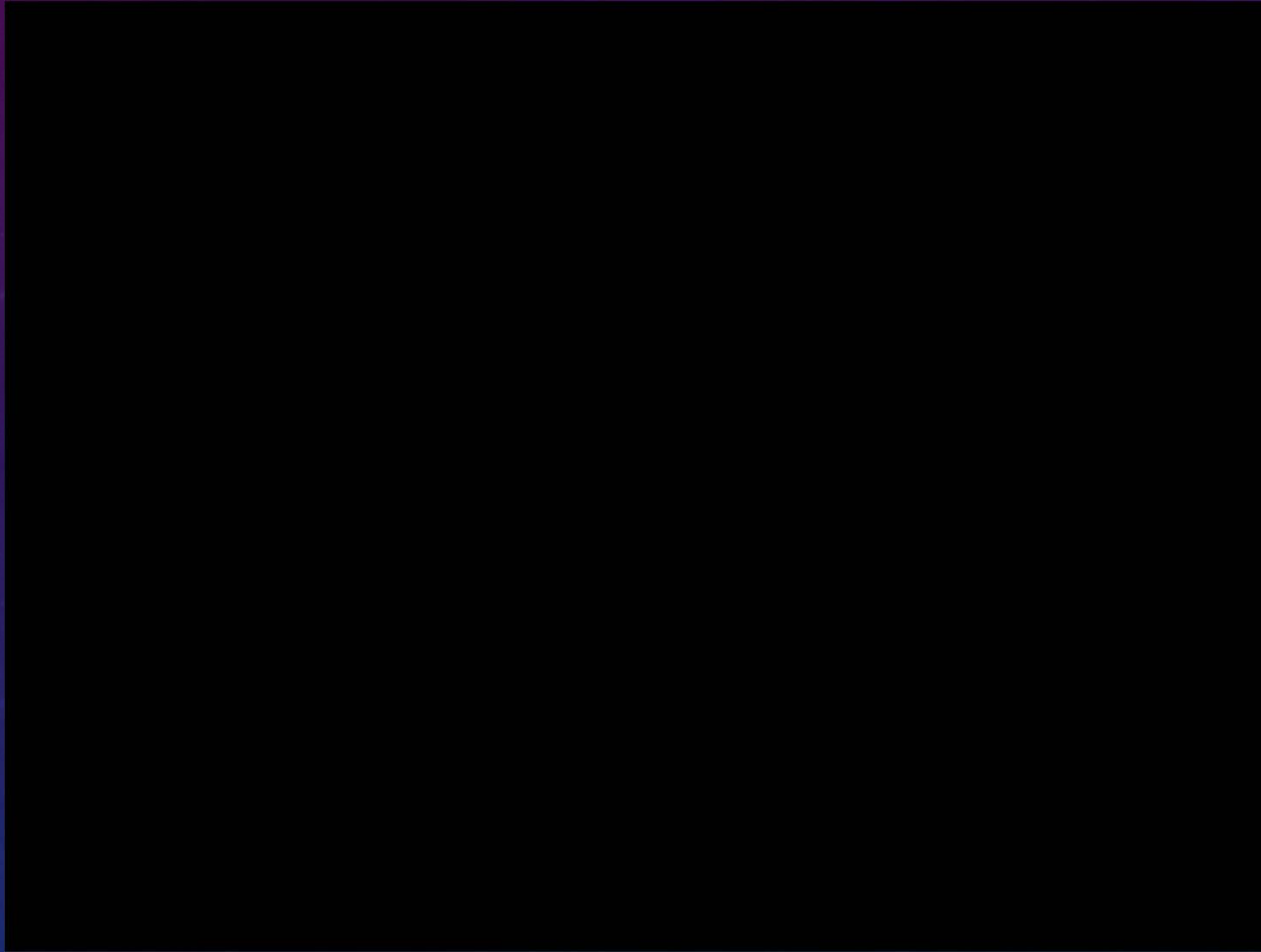
POKROČILÉ METODY STUDIA UČENÍ A PAMĚTI

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

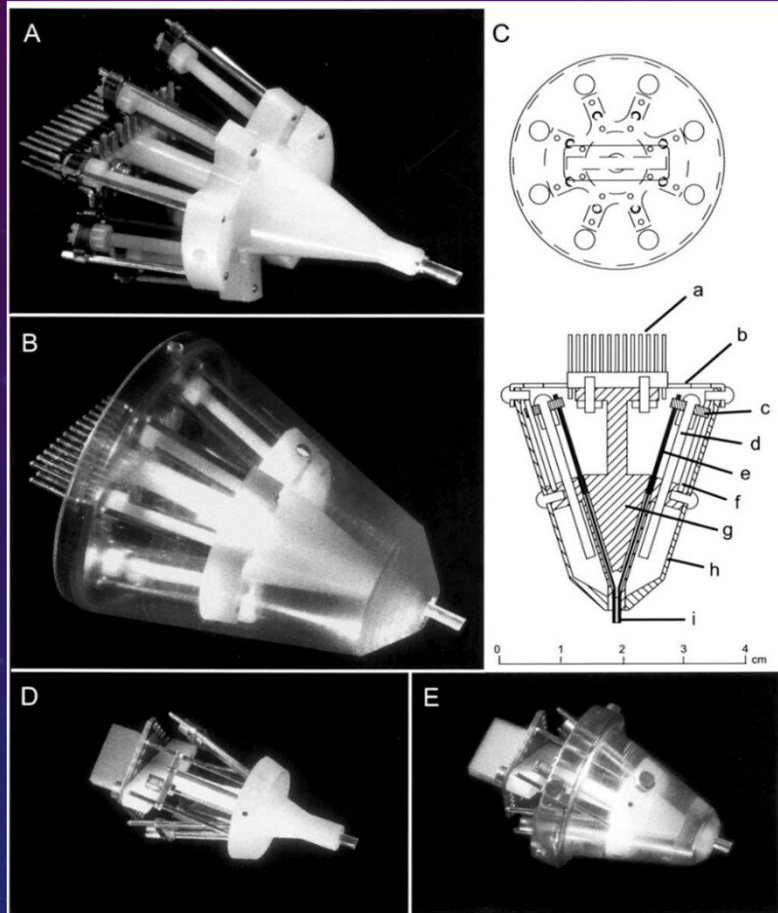
ELEKTROFYZIOLOGIE

- Multiple single unit recording
- Hippocampal place cells
- Tetrody
- Klastrování
 - rozřídění multijednotkového záznamu na jednotlivé neurony
 - Firing rate maps
 - zprůměrovaná aktivita jednotlivých neuronů vynesena v prostoru
 - Spike time series
 - aktivita vynesena v čase – detaily konkrétní epizody
 - Vector analysis of ensemble activity
 - V každém okamžiku je aktivita celé populace vyjádřena jako **vektor** jehož rozměry jsou všechny spolehlivě rozlišené jednotky.
 - Tyto aktivní vektory „ukazují“ na různá „místa“ v mnohazměrném prostoru odpovídající specifickým reprezentacím v kognitivní mapě vlastních vědomostí.

PLACE CELLS



MICRODRIVE A HEADSTAGE



Jog et al., J Neurosci Meth, 2002

MICRODRIVE PRO POTKANY S ŠESTI TETRODAMI

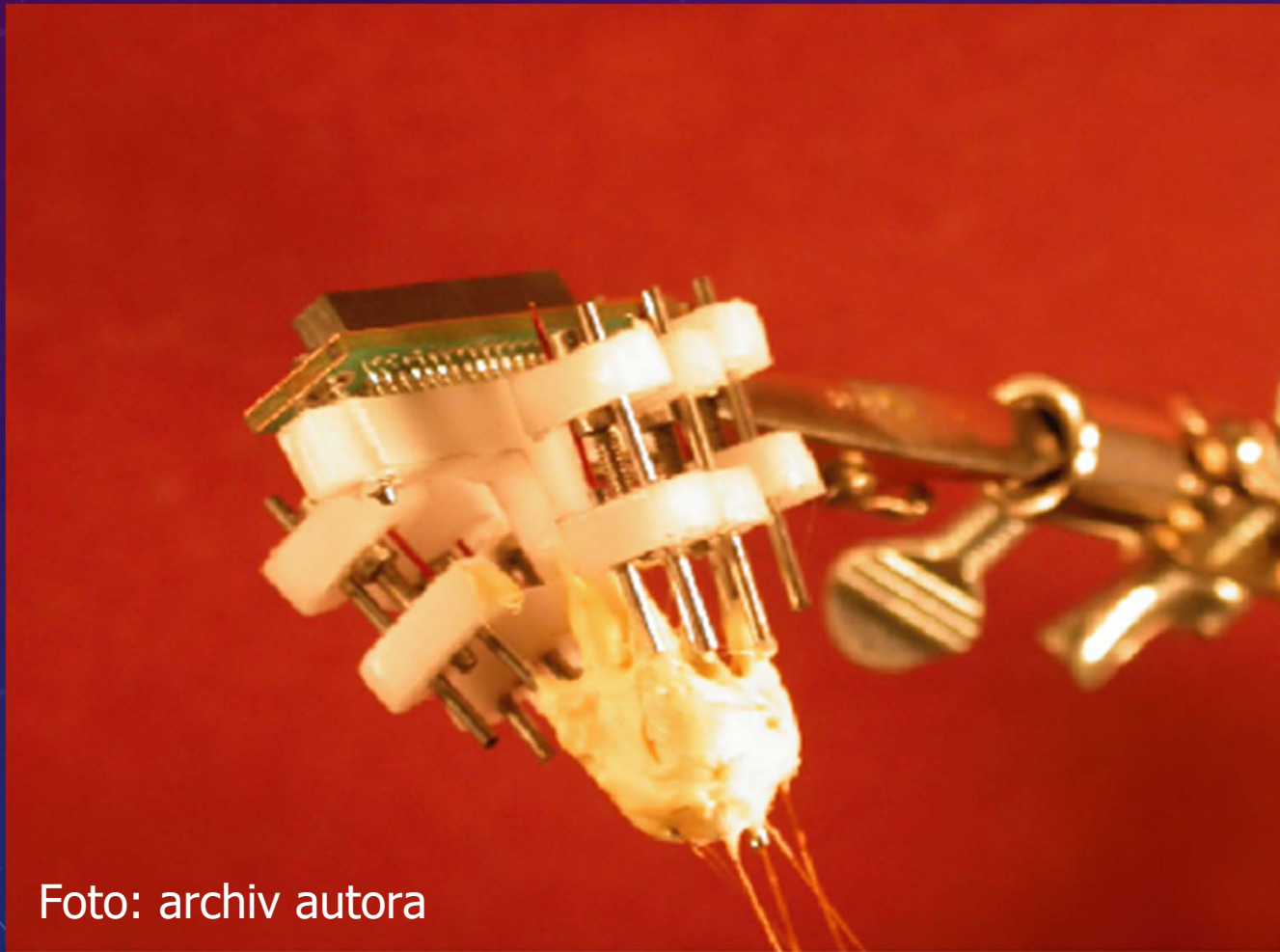


Foto: archiv autora

MICRODRIVE PRO MYŠI S DVĚMA TETRODAMI

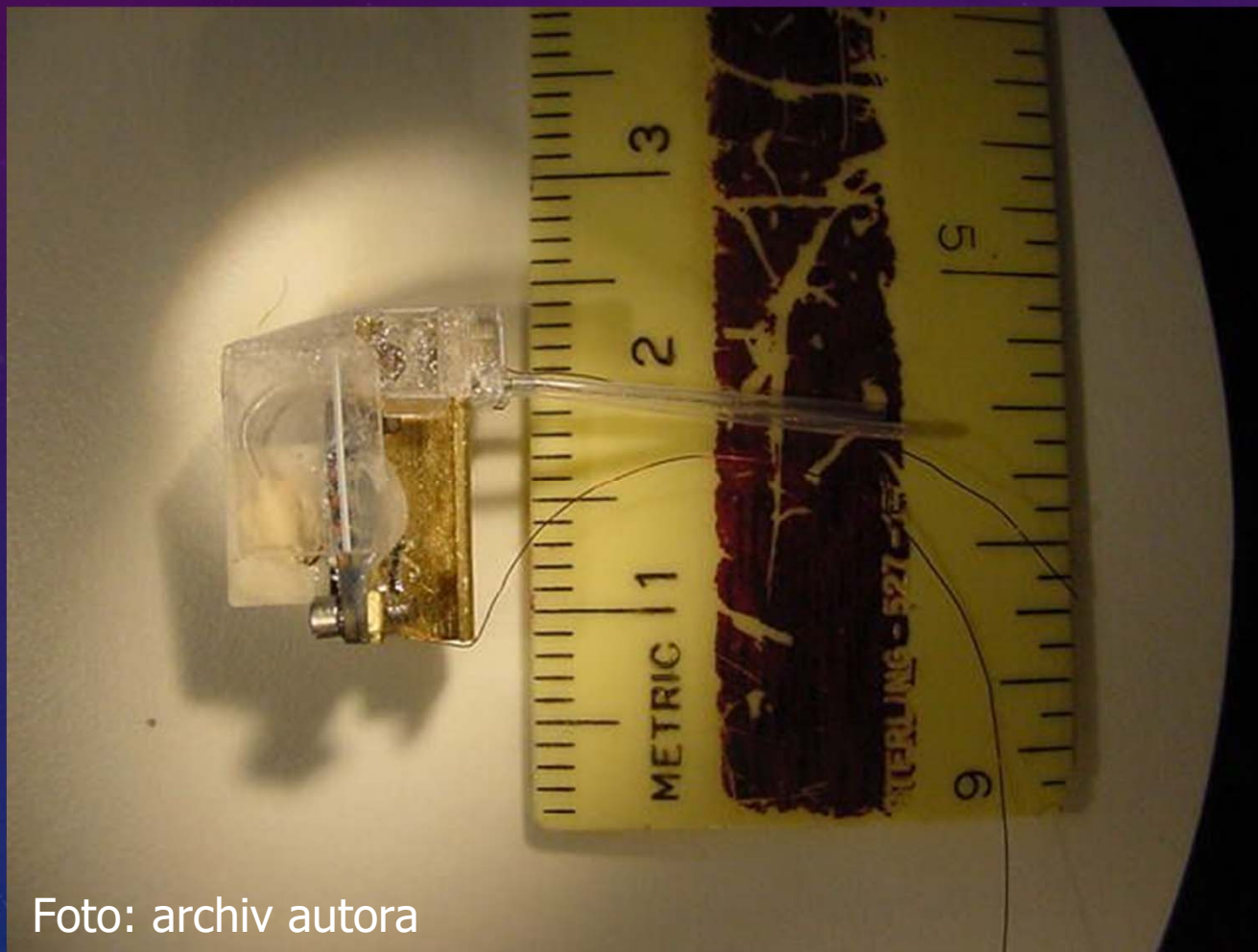
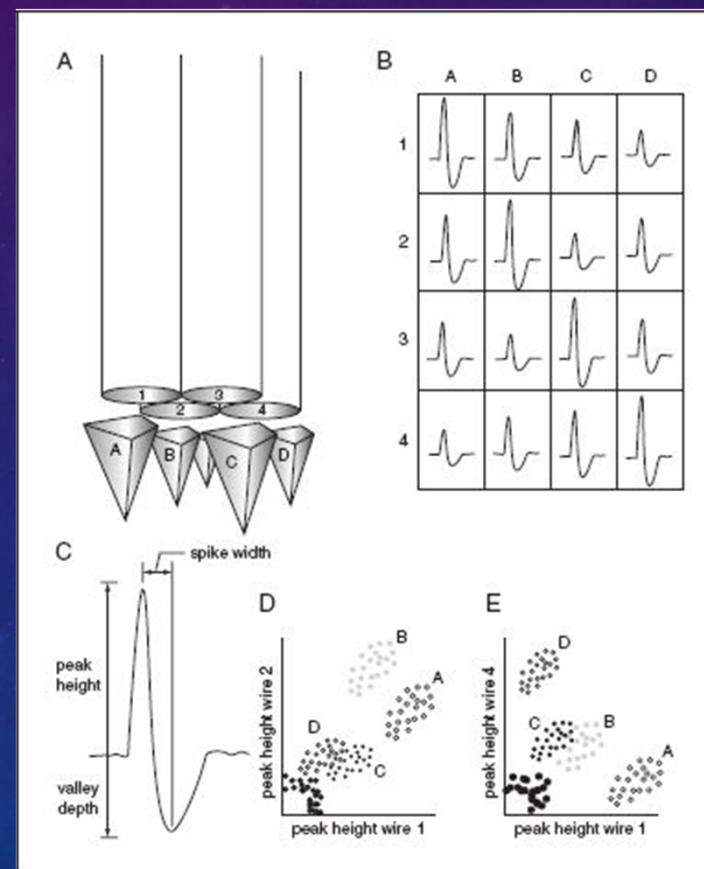


Foto: archiv autora

KLASTROVÁNÍ - MULTIUNIT RECORDING

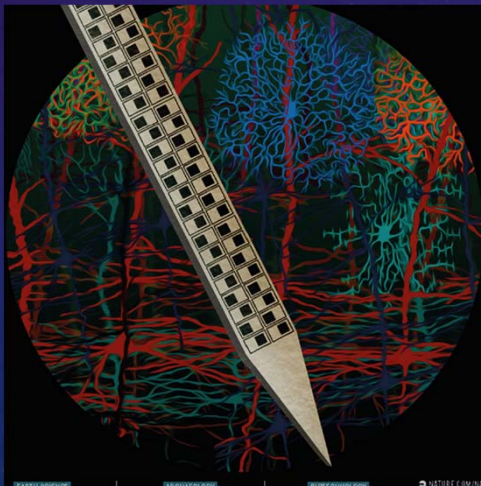
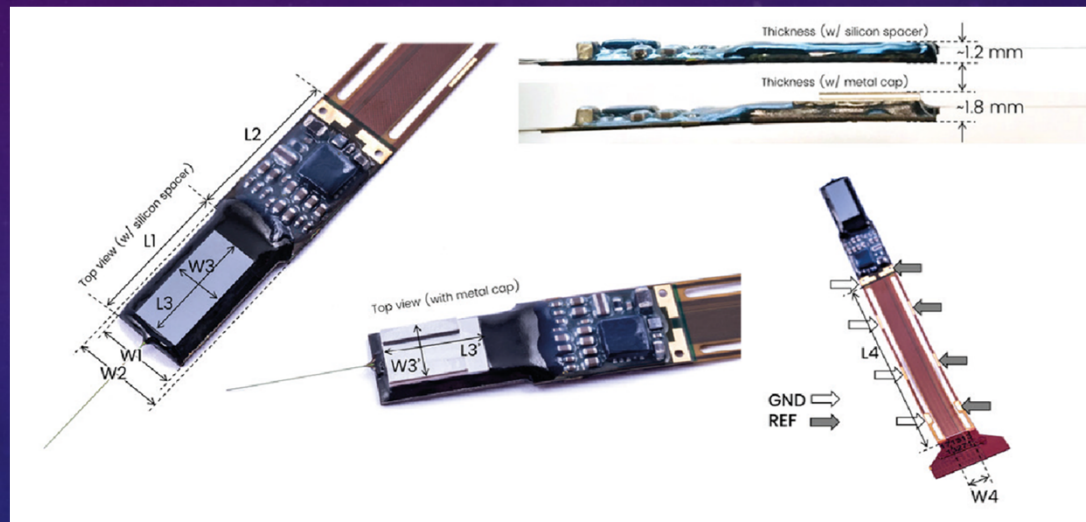
- Všechny elektrody 1234 jedné tetrody vidí stejné neurony ABCD, ale každá z jiného úhlu.
- Spiky z jednotlivých neuronů vynesené v prostoru jehož dimenzemi jsou parametry z jednotlivých elektrod vytváří shluky (clustery).

Szymusiak & Nitz, Curr Prot Neurosci
6.16, 2002



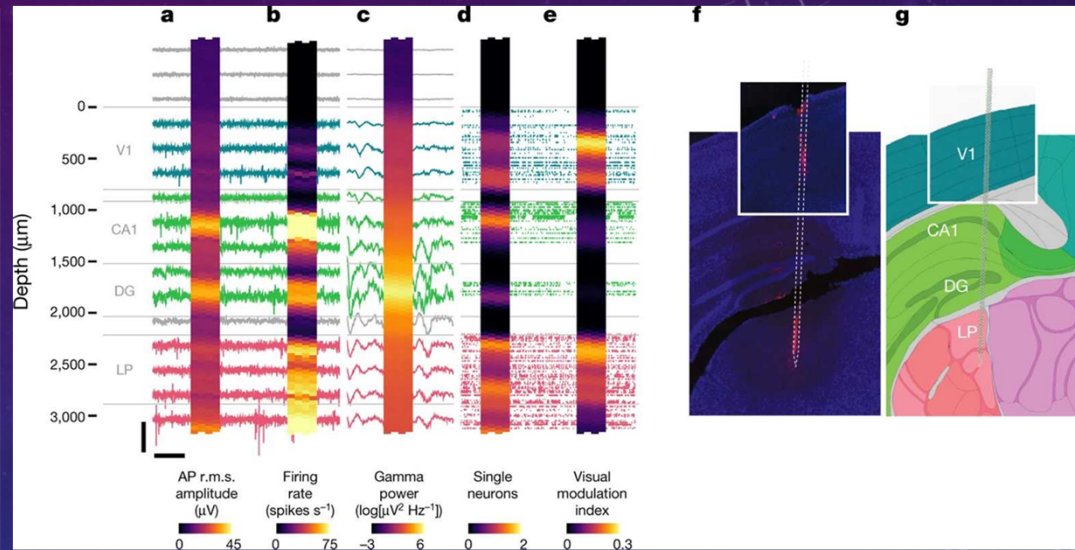
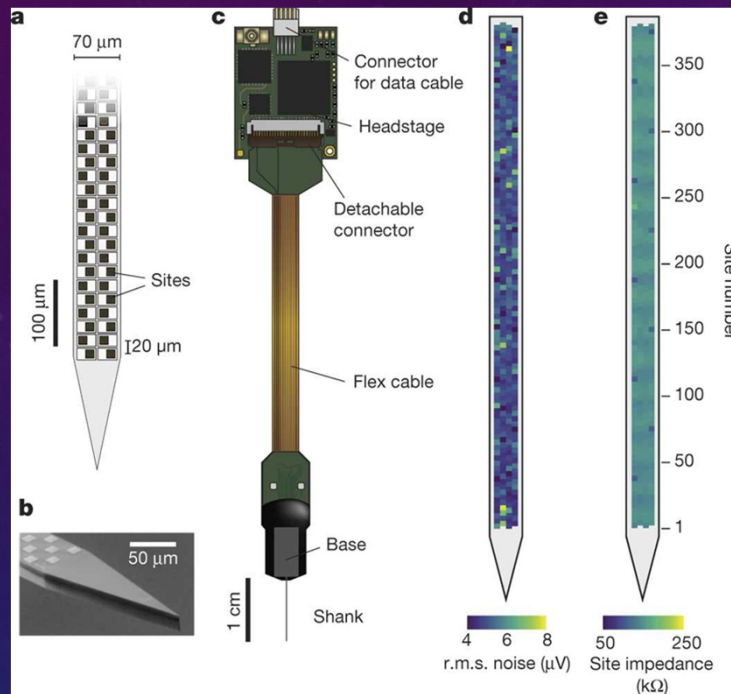
NEUROPIXELS 1.0

TECHNOLOGIE 21. STOLETÍ



- Fully-integrated CMOS digital neural probe
- Odpadá potřeba zdlouhavého hledání aktivity – lepší plánování
- Umožňuje dlouhodobé stabilní nahrávky
- Malá a lehká proba (0.4 g) i headstage (0.9 g)
- Compatible with SpikeGLX and OpenEphys software

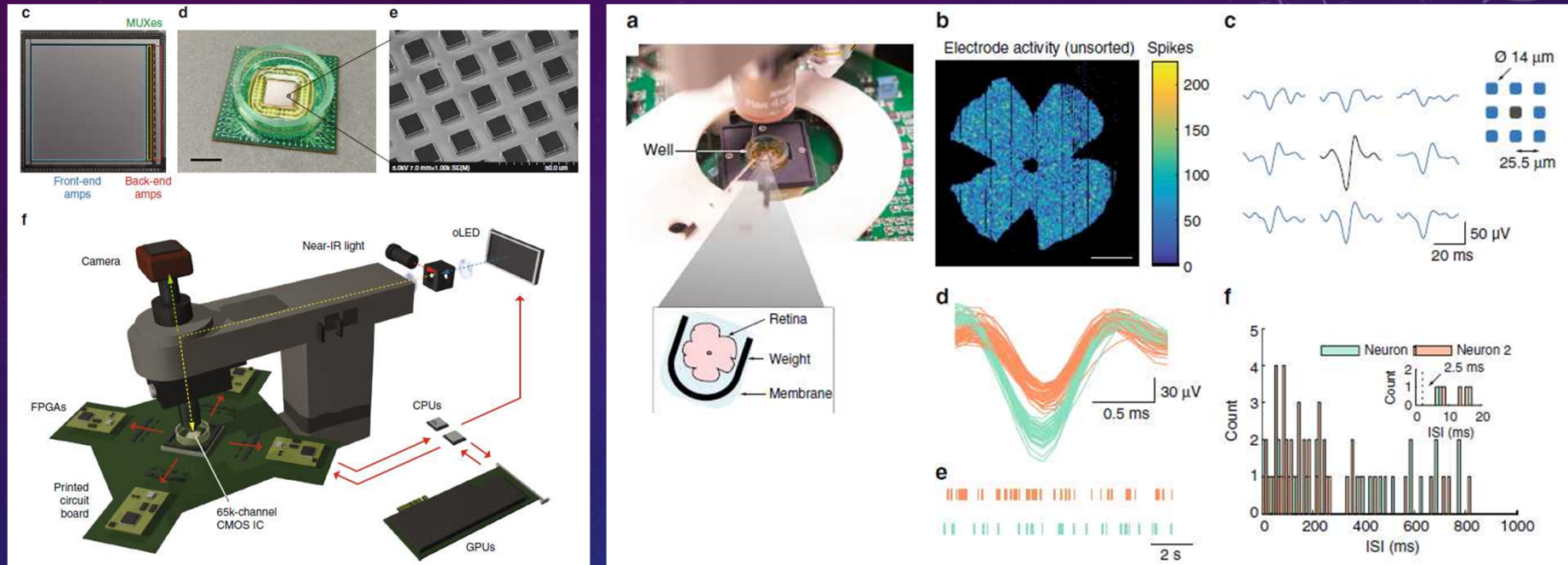
NEUROPIXELS



Jun et al. (2007) Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature* 551: 232-236.

- Large (10 mm), dense (100 sites/mm) implantable neural recording device
- Hundreds of well resolved single neuron signal traces with each probe
- Simultaneous recordings across multiple brain regions
- More than 700 neurons using two Neuropixels probes
- High neuron count and excellent signal-to-noise performance

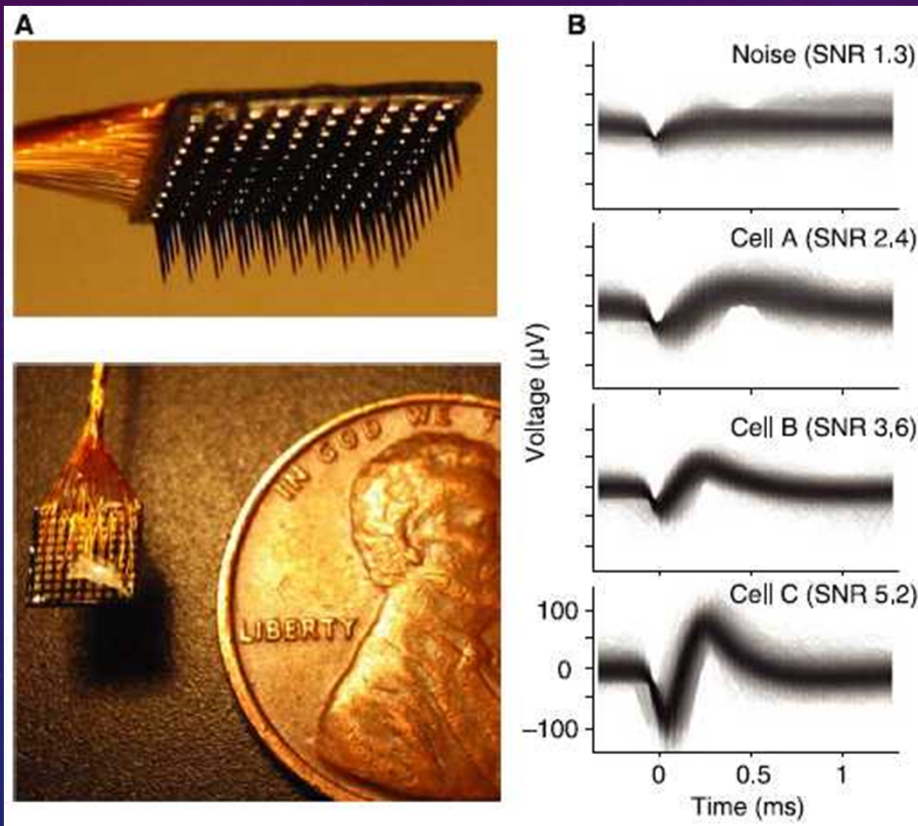
MICROELECTRODE ARRAY IN VITRO



compressed sensing concepts + silicon complementary metal-oxide-semiconductors - CMOS
 Cell culture and in vitro recordings – e.g. explanted retina, organotypic slices
 65 536 simultaneously recording and stimulating electrodes
 per-electrode electronics consume an area of 25.5 X 25.5 μm

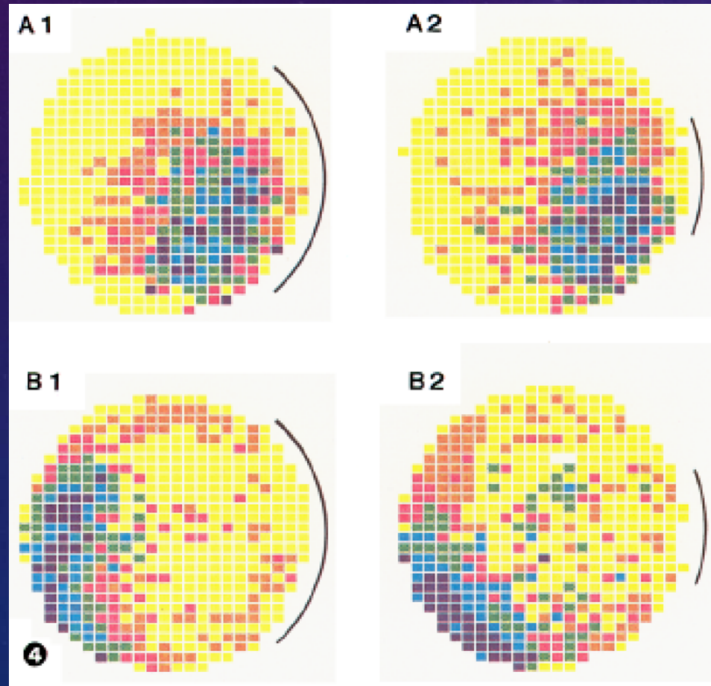
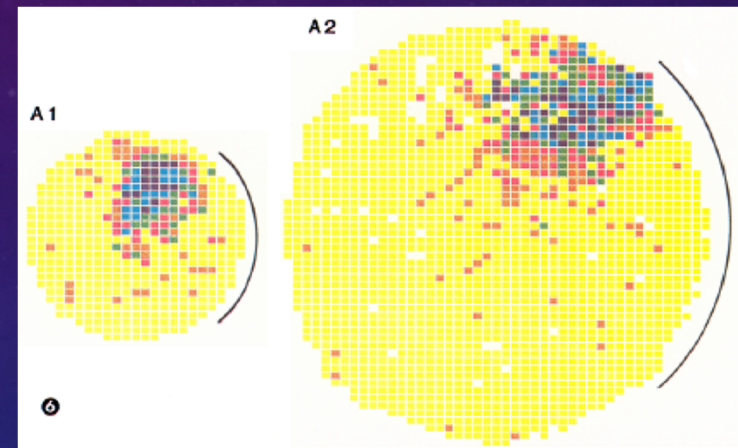
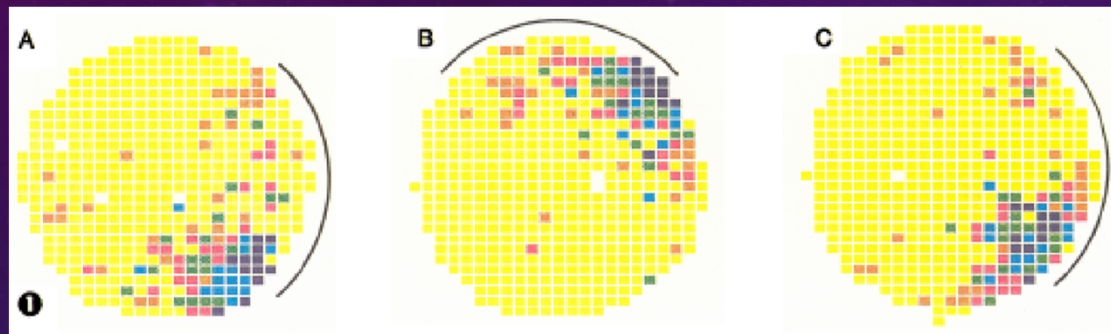
Tsai et al. (2017) A very large-scale microelectrode array for cellular-resolution electrophysiology. Nat Commun 8(1):1802.

MICROELECTRODE ARRAY IN VIVO

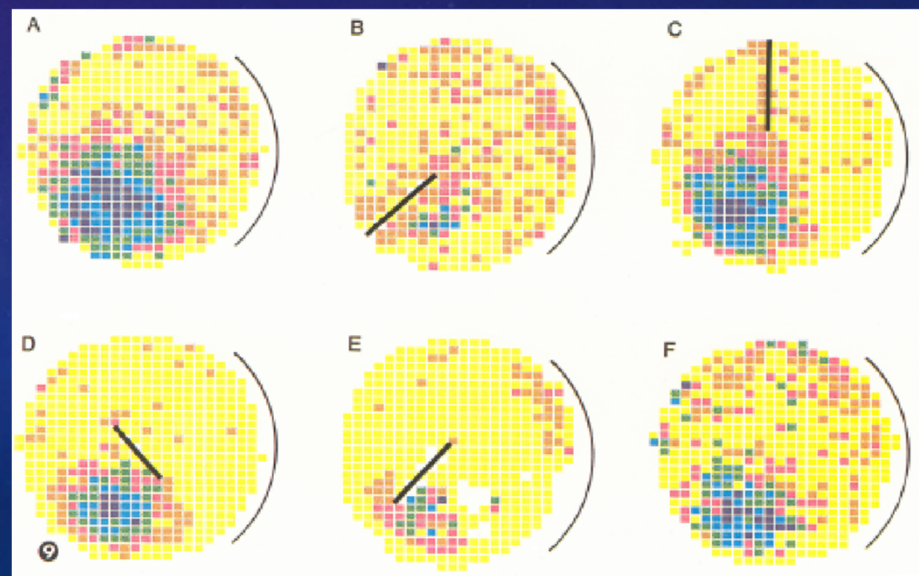


- Cyberkinetics “Utah” Array - Cyberkinetics Neurotechnology Systems, Foxborough, MA
- 10 X 10 grid of silicon microelectrodes (1 mm in length) spaced 400 μm apart, covering 12.96 mm^2 .
- Recording from visual cortex of anesthetized monkeys and cats
- Kelly et al. (2007) Comparison of recordings from microelectrode arrays and single electrodes in the visual cortex. *J Neurosci* 27(2):261-4.

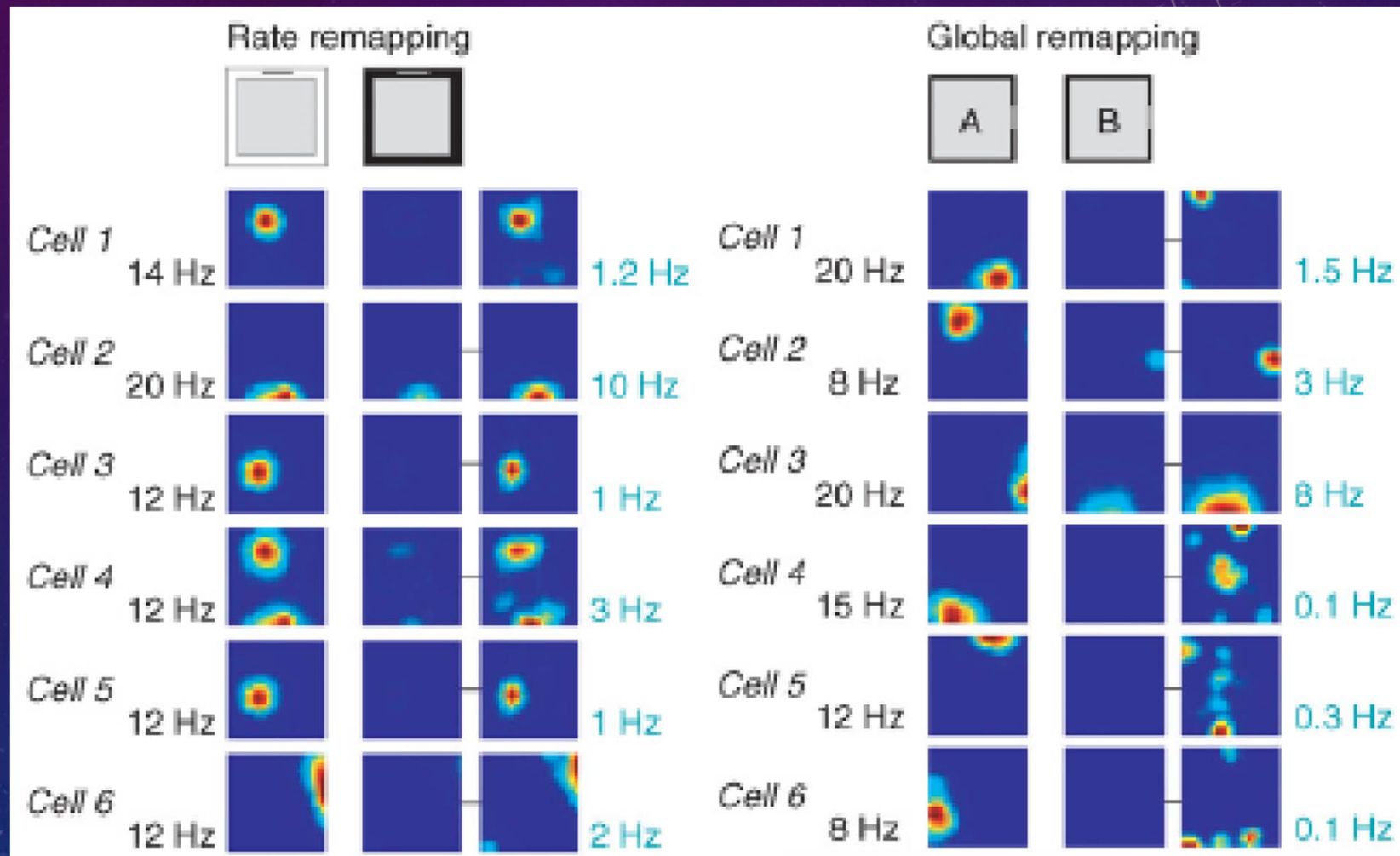
FIRING RATE MAPS A ZMĚNY V PROSTŘEDÍ



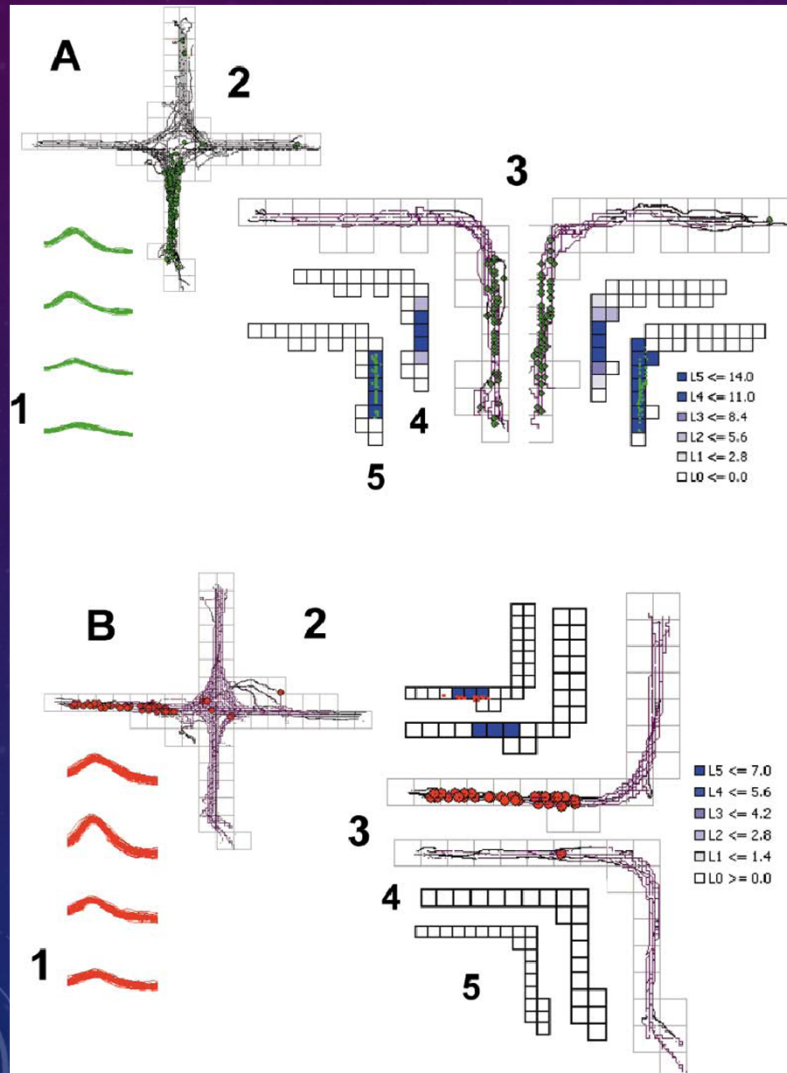
Muller & Kubie, 1987



REMAPPING

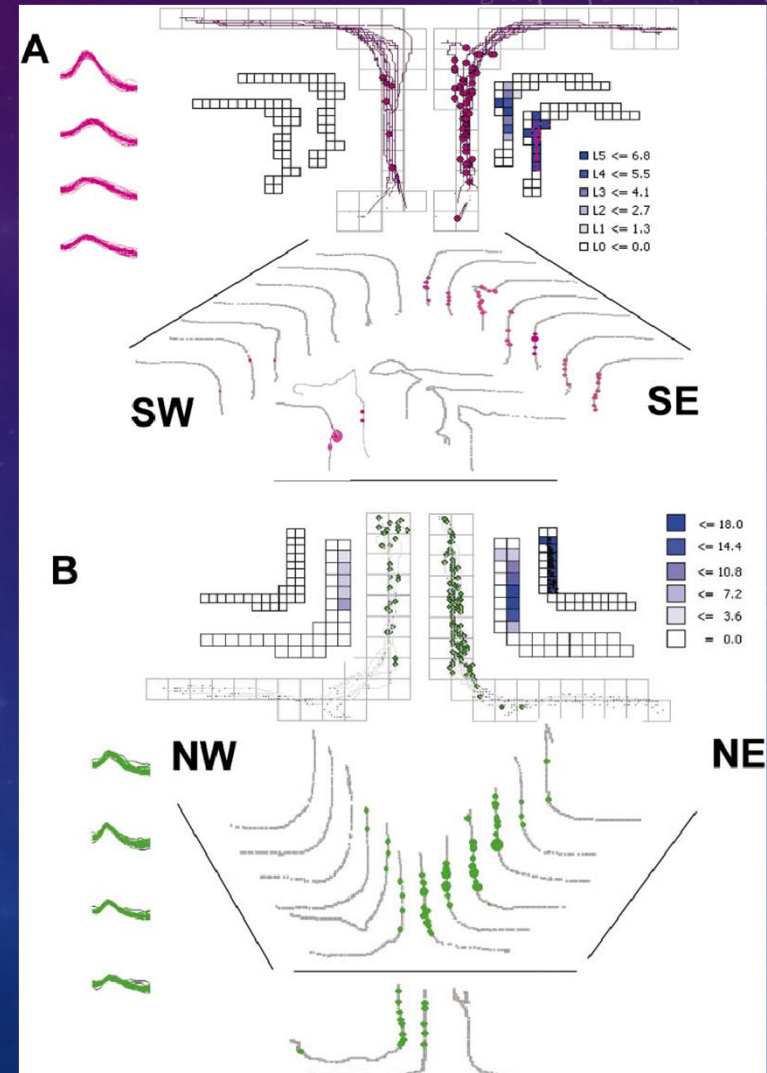


RETROSPECTIVE AND PROSPECTIVE CODING



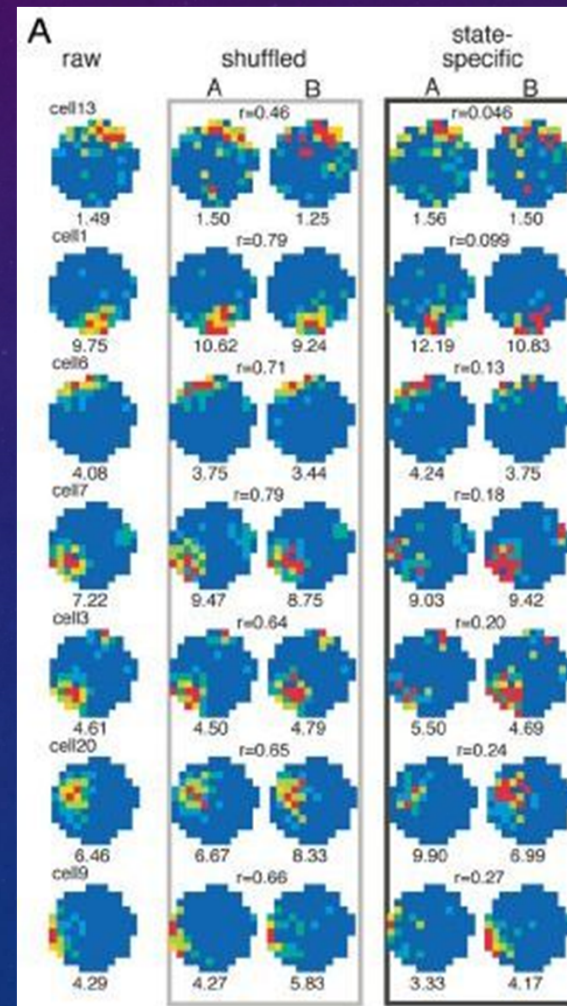
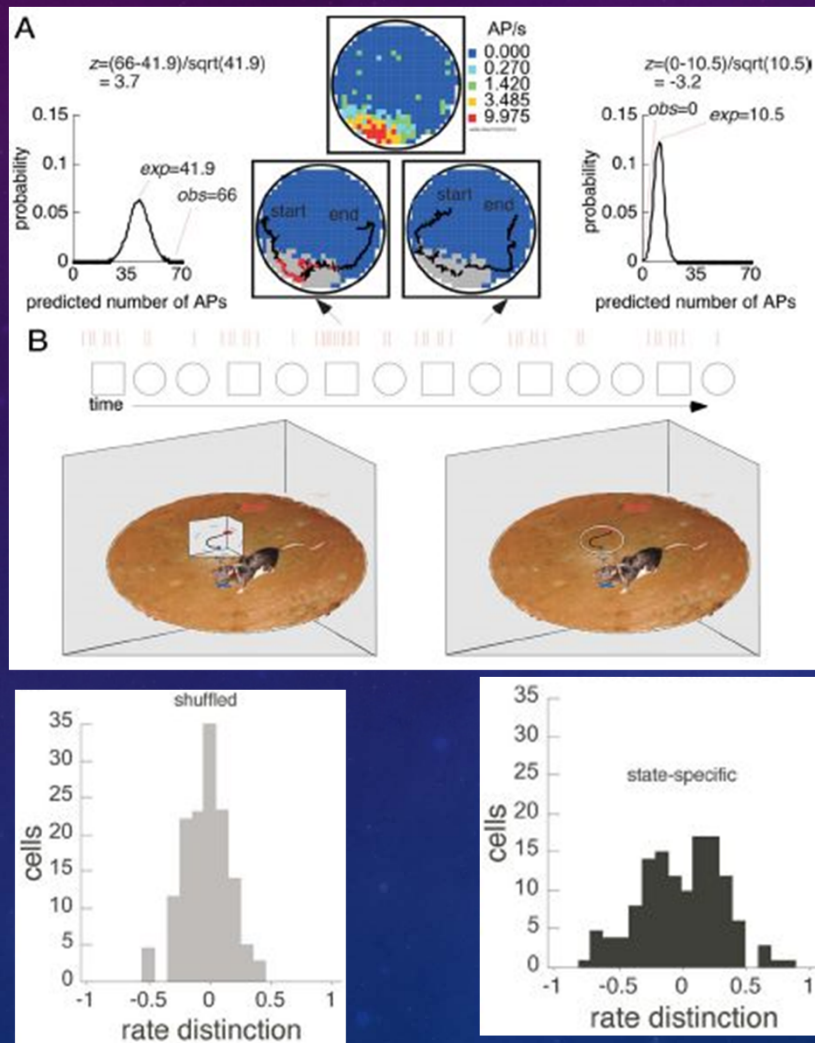
retrospective

Ferbinteanu and Shapiro, Neuron, 2003

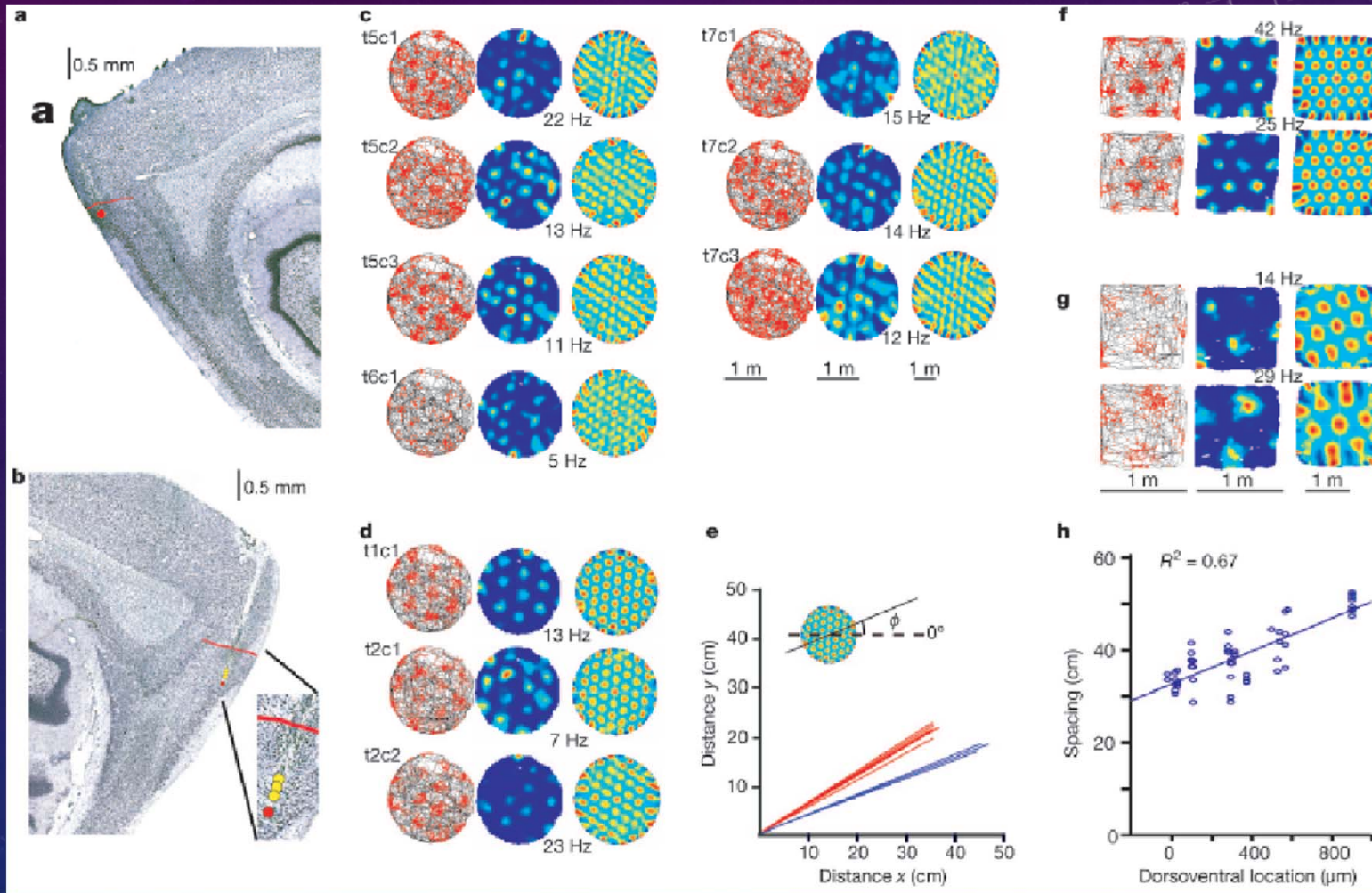


prospective

OVERDISPERSION



ENTORRHINAL GRID CELLS



Hafting et al., Nature, 2005

POKROČILÉ METODY STUDIA UČENÍ A PAMĚTI

- Elektrofyzologie
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- **IEG Imaging**
- Intervenční techniky
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

IEG IMAGING

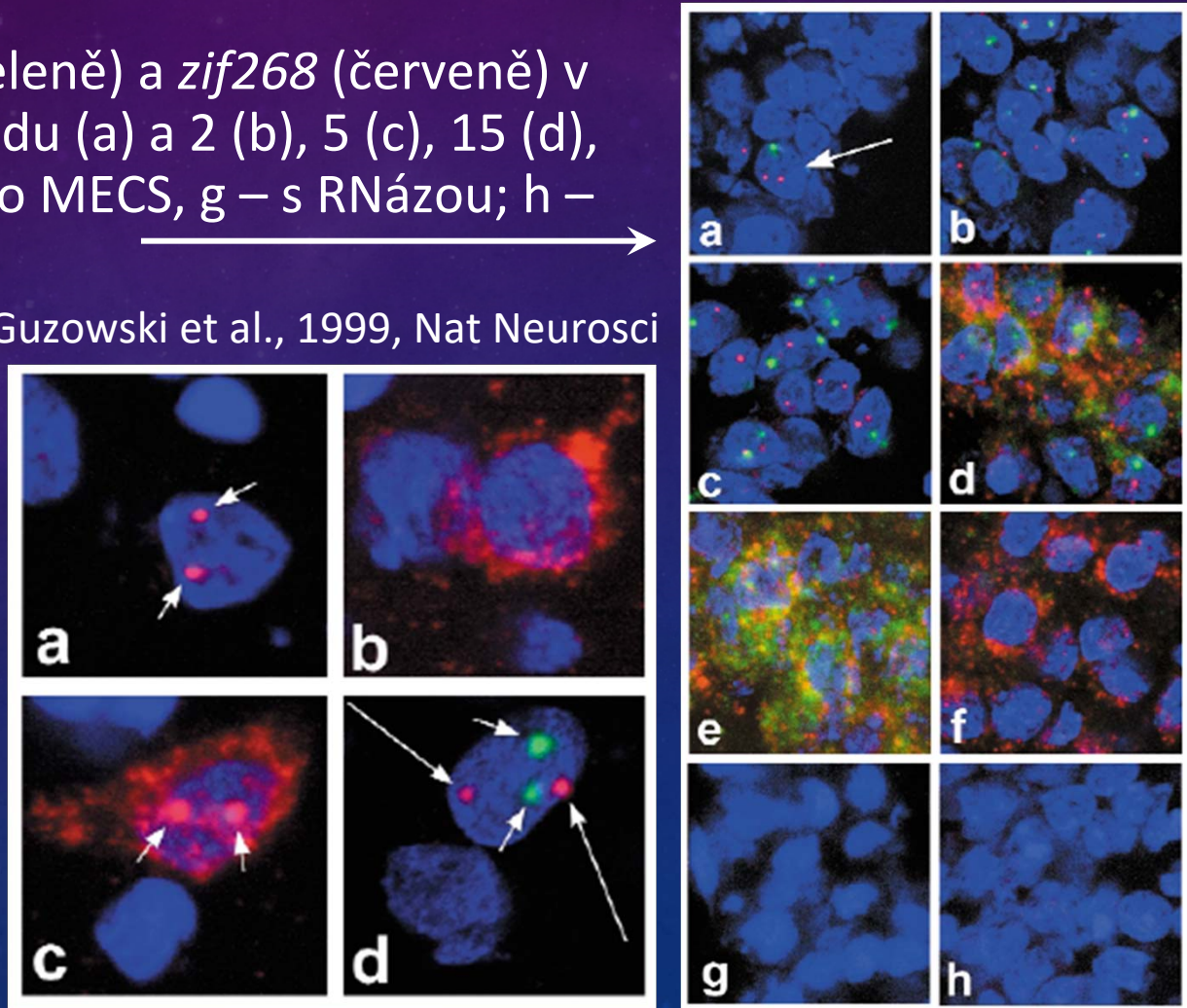
- Nervová aktivita spouští expresi genů časně odpovědi (immediate-early genes – IEGs) v neuronech
 - C-fos, zif268/erg/..., Narp, BDNF, Arc, Homer1a
- RNA
 - in situ hybridization
 - Radioaktivní
 - Fluorescenční - FISH
 - qPCR
 - Northern blot
- Protein
 - Immunohistochemistry
 - Western blot

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

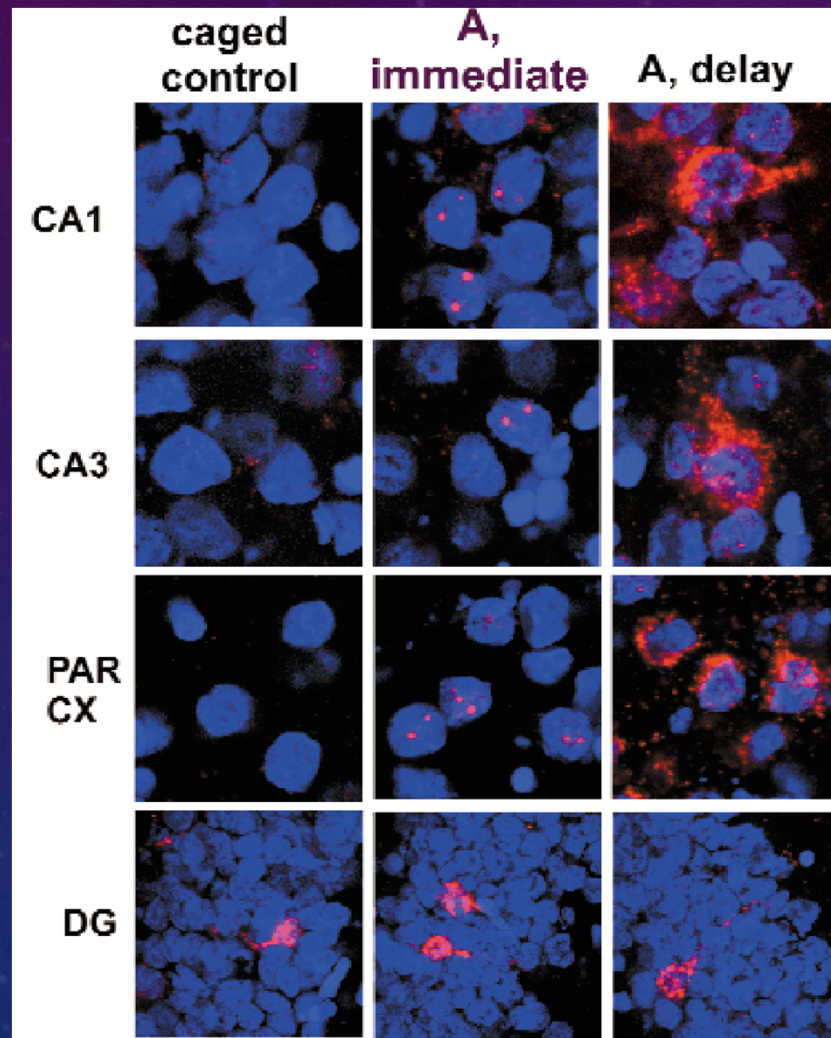
Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci

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)



CATFISH

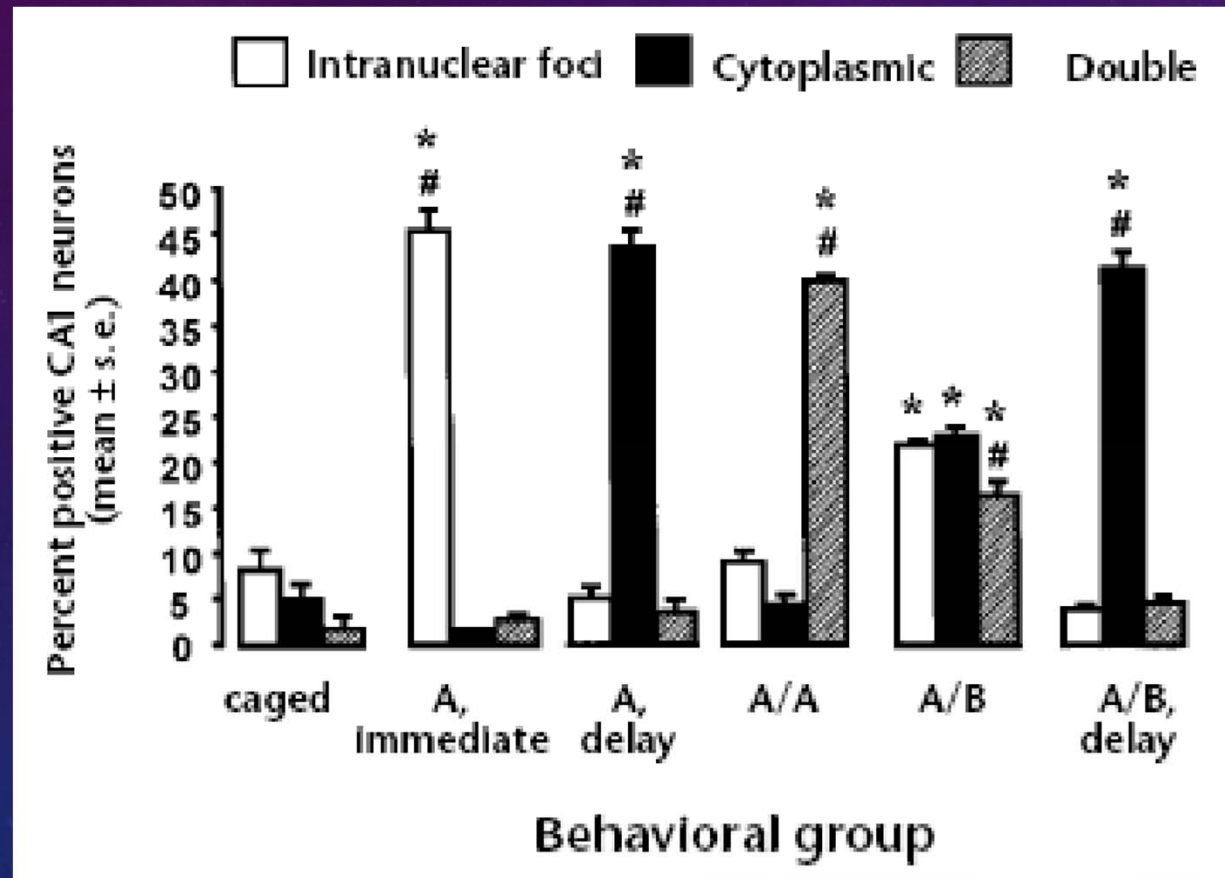
CELLULAR COMPARTMENT ANALYSIS OF TEMPORAL ACTIVITY BY FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION



- Intranukleární exprese *Arc* (primární RNA transkript) se objevuje 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

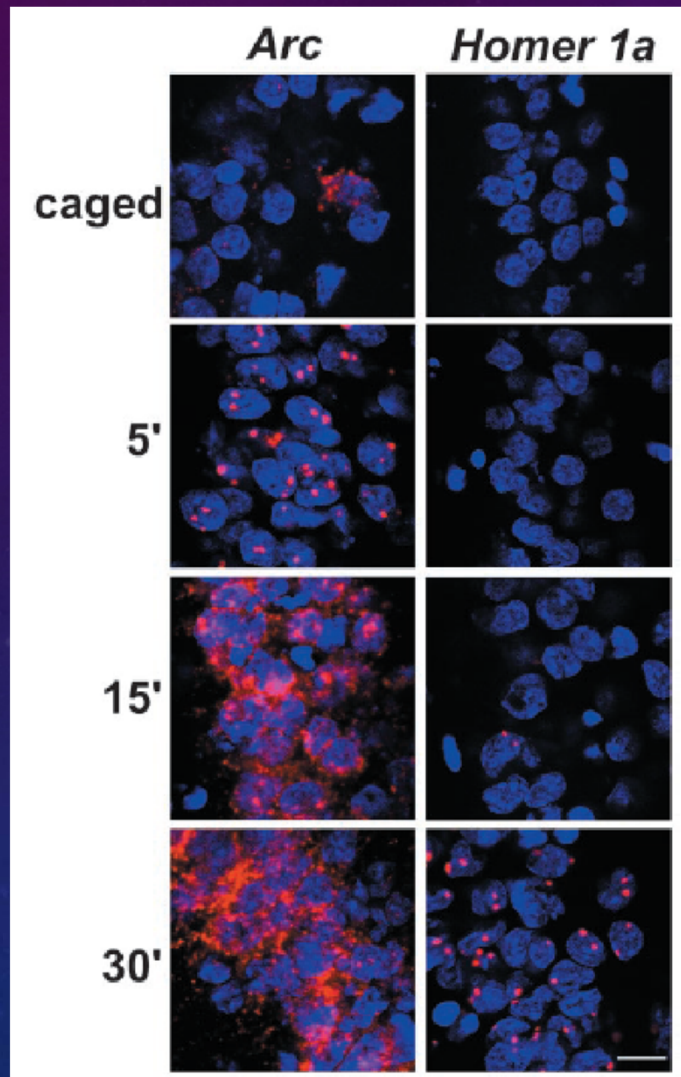
KONTEXTUÁLNÍ SPECIFICITA EXPRESE ARC



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.

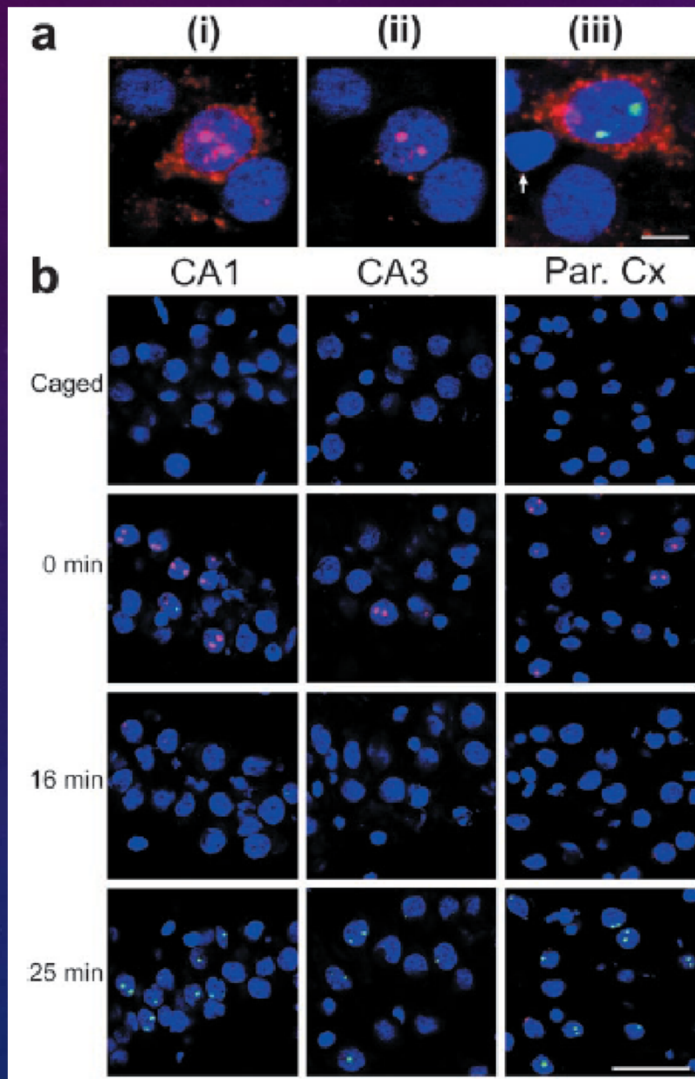
Guzowski et al., 1999, Nat
Neurosci

ZPOŽDĚNÝ VÝSKYT SIGNÁLU Z *HOMER1A*

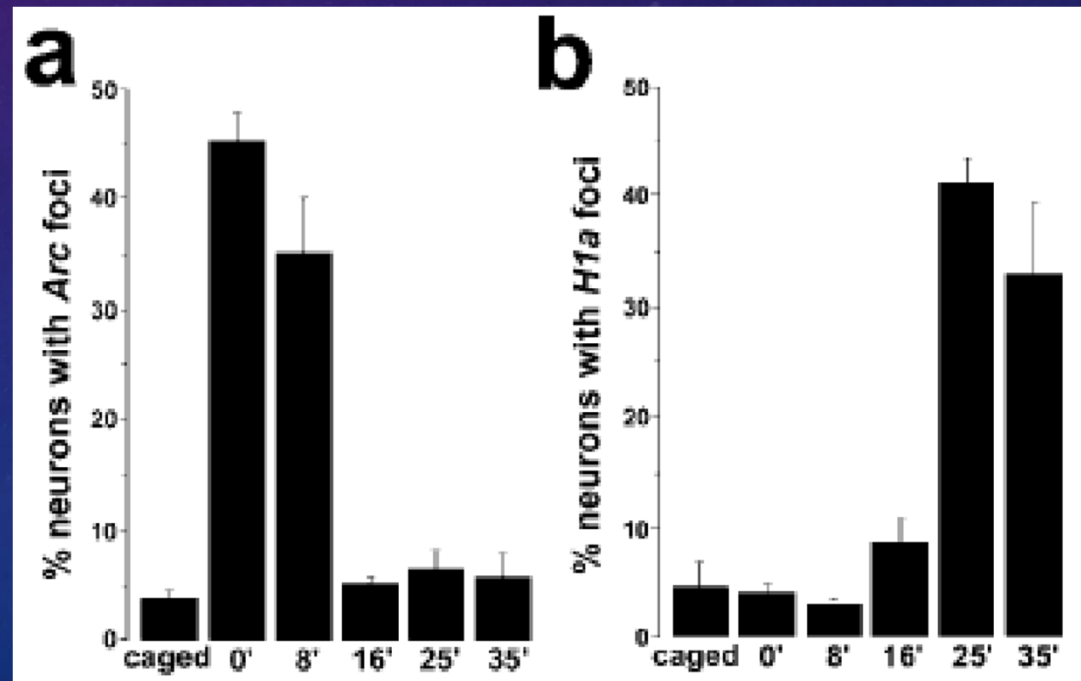


- Intranukleární signál (INF) *Homer1a* se objevuje 30 minut po indukující stimulaci (MECS).
- Toto zpoždění je dáno pozicí próby na 3'UTR na primárním transkriptu (~40 kb od počátku) a omezené elongační rychlosti RNA polymerázy II (~1.4kb/min).
- INF *H1a* se časově shoduje s cytoplasmatickým *Arc*.

ARC A HOMER1A INF POCHÁZEJÍ Z RŮZNÝCH ČASOVÝCH ÚSEKŮ

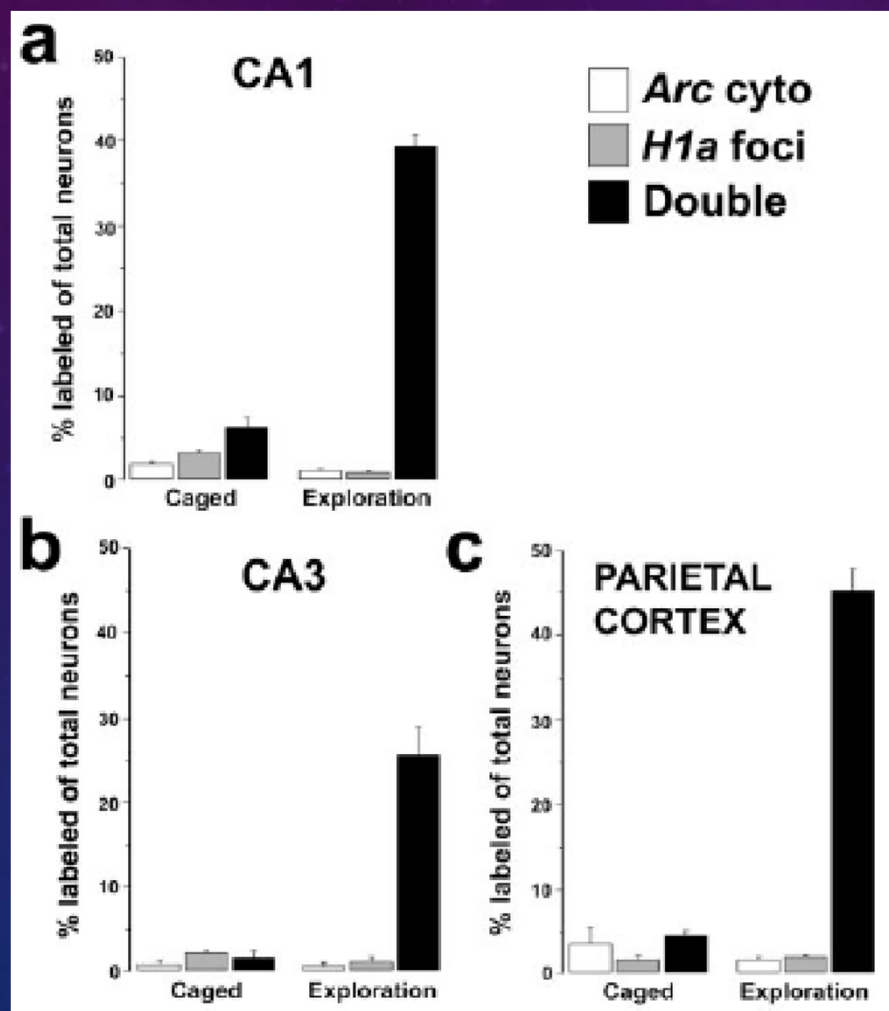


Časový odstup *Homer1a* signálu (zeleně) je zachován i po exploraci nového prostředí (open field).



Vazdarjanova et al., 2002, J Neurosci

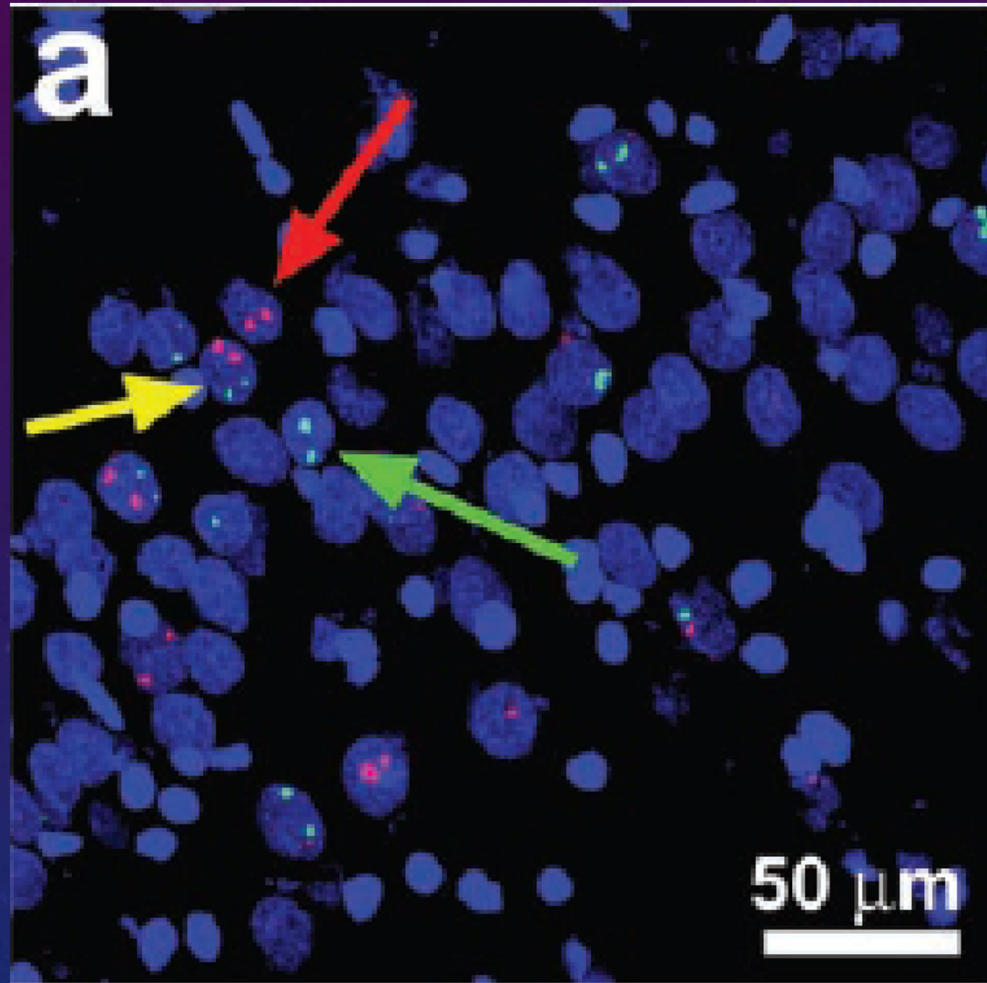
INF *H1A* KOLOKALIZUJE S *ARC* V CYTOPLAZMĚ



- 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.

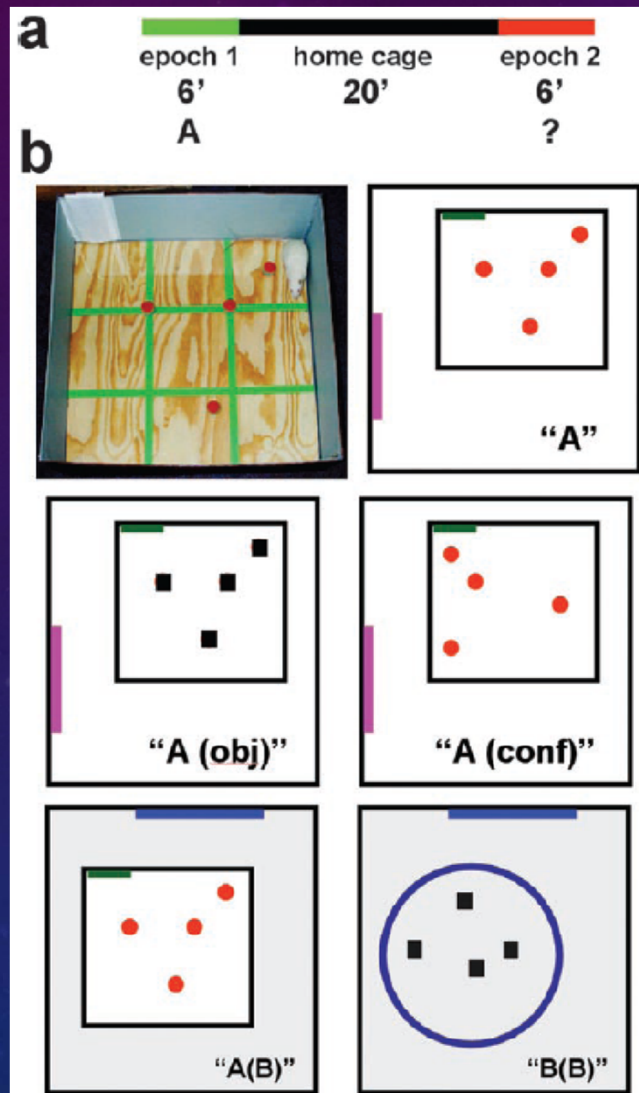
Vazdarjanova et al., 2002, J Neurosci

ARC/HOMER1A CATFISH



Jádra neuronů jsou značena modře (DAPI). *Homer1a* (zelený fluorescein) značí neurony aktivní během první epizody a *Arc* (červený Cy3) značí neurony aktivní během druhé epizody ~25 min dříve. Double-pozitivní neurony byly aktivní během obou epizod.

CONTEXT EXPLORATION TASK

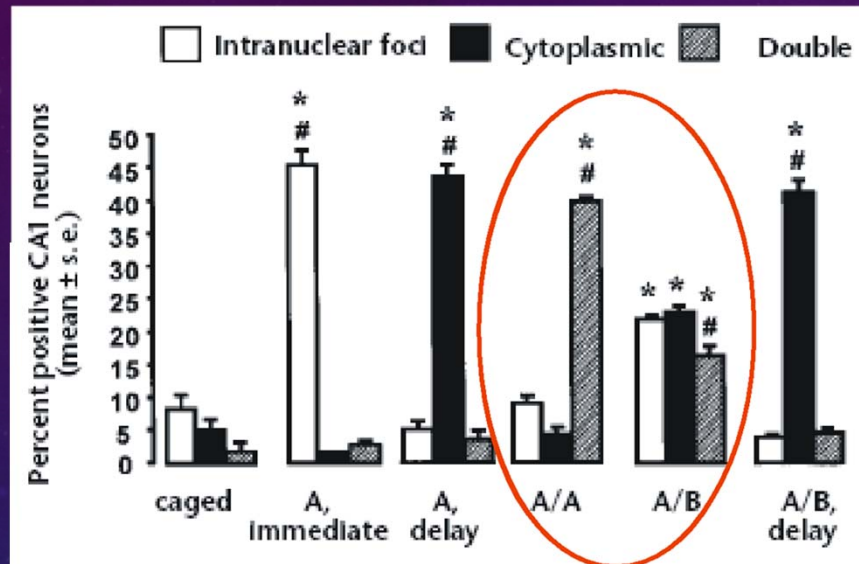


Zvířata byla vypuštěna na 6 min jednou v prostředí A, navracena do svých klecí, a 20 min později podruhé vypuštěna v tomtéž prostředí A, v modifikovaném prostředí A' buď s jinými objekty Aobj, s jiným uspořádáním stejných objektů Aconf, anebo s jinými vzdálenými orientačními značkami Ab, anebo v úplně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

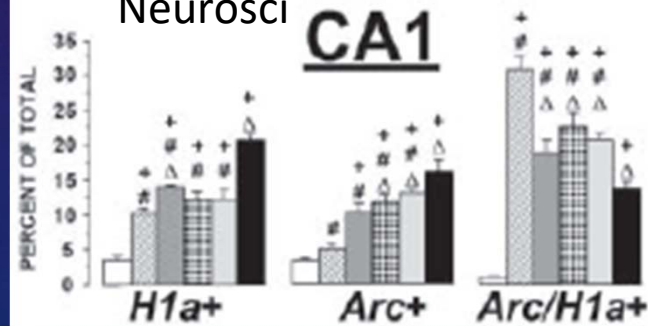
Kontrolní zvířata (caged controls - CC) zůstala ve svých klecích po celou dobu.

Vazdarjanova and Guzowski, 2004, J Neurosci

CA1 A CA3 REAGUJÍ ODLIŠNĚ NA ZMĚNY V PROSTŘEDÍ



Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci

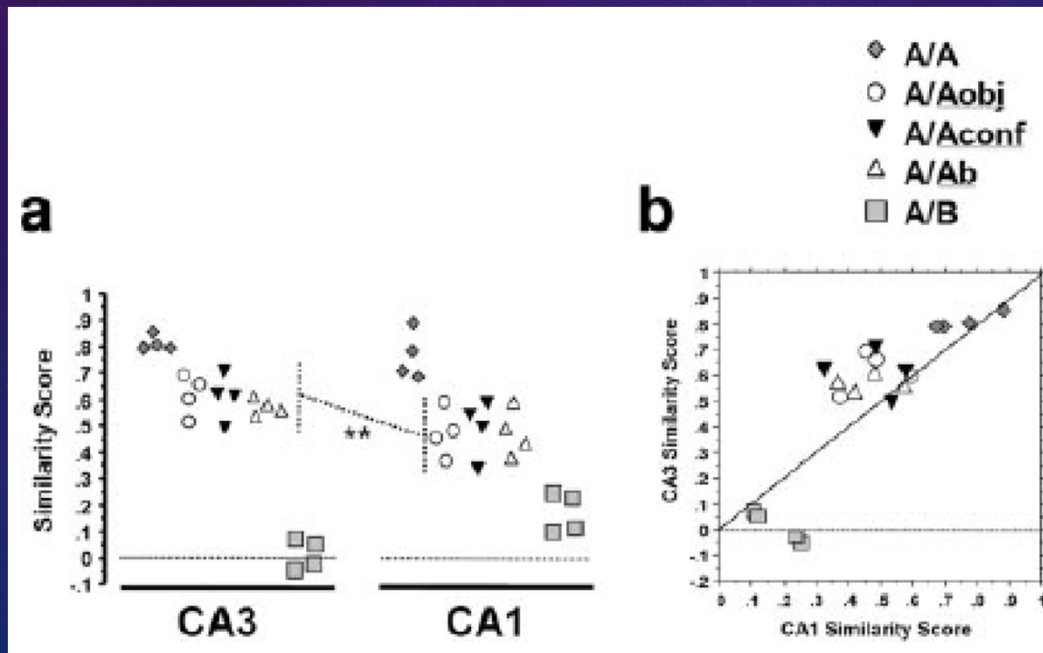


Vazdarjanova and Guzowski, 2004, J Neurosci

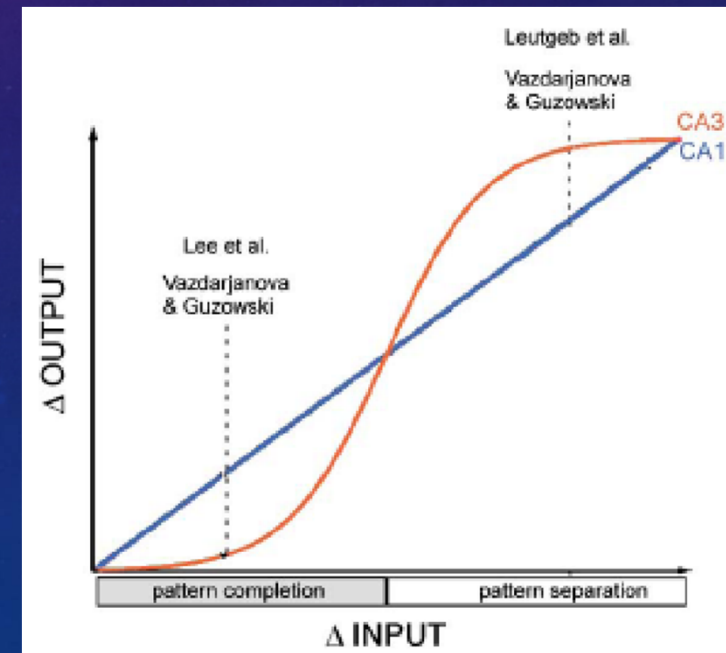
- Ve stejném prostředí (A/A) se populace aktivních neuronů (neural ensembles) v CA1 i v CA3 z valné části překrývají.
- V různých prostředích (A/B) jsou aktivní skupiny v CA3 statisticky nezávislé, zatímco v CA1 nadále přetrvává jistá podobnost skupin.
- Při mírných změnách (A/A') je podobnost vyšší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

KONTEXTUÁLNÍ SPECIFICITA 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.

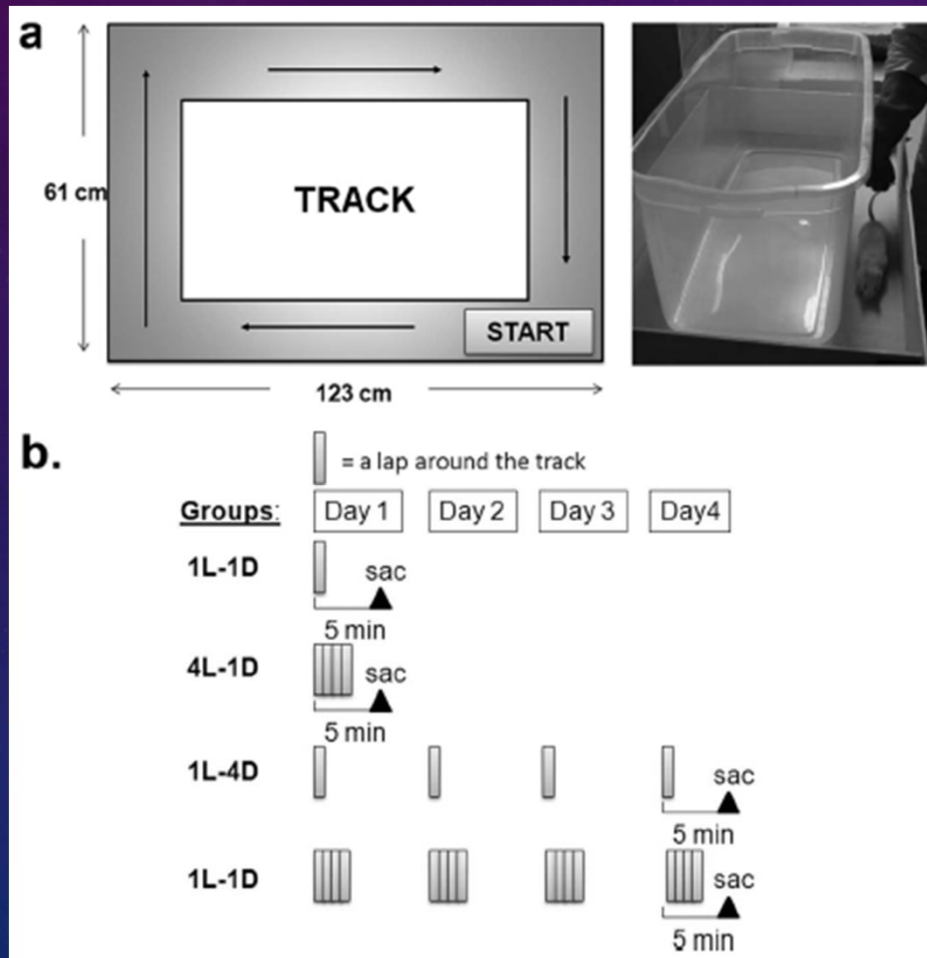


Vazdarjanova and Guzowski, 2004, J Neurosci



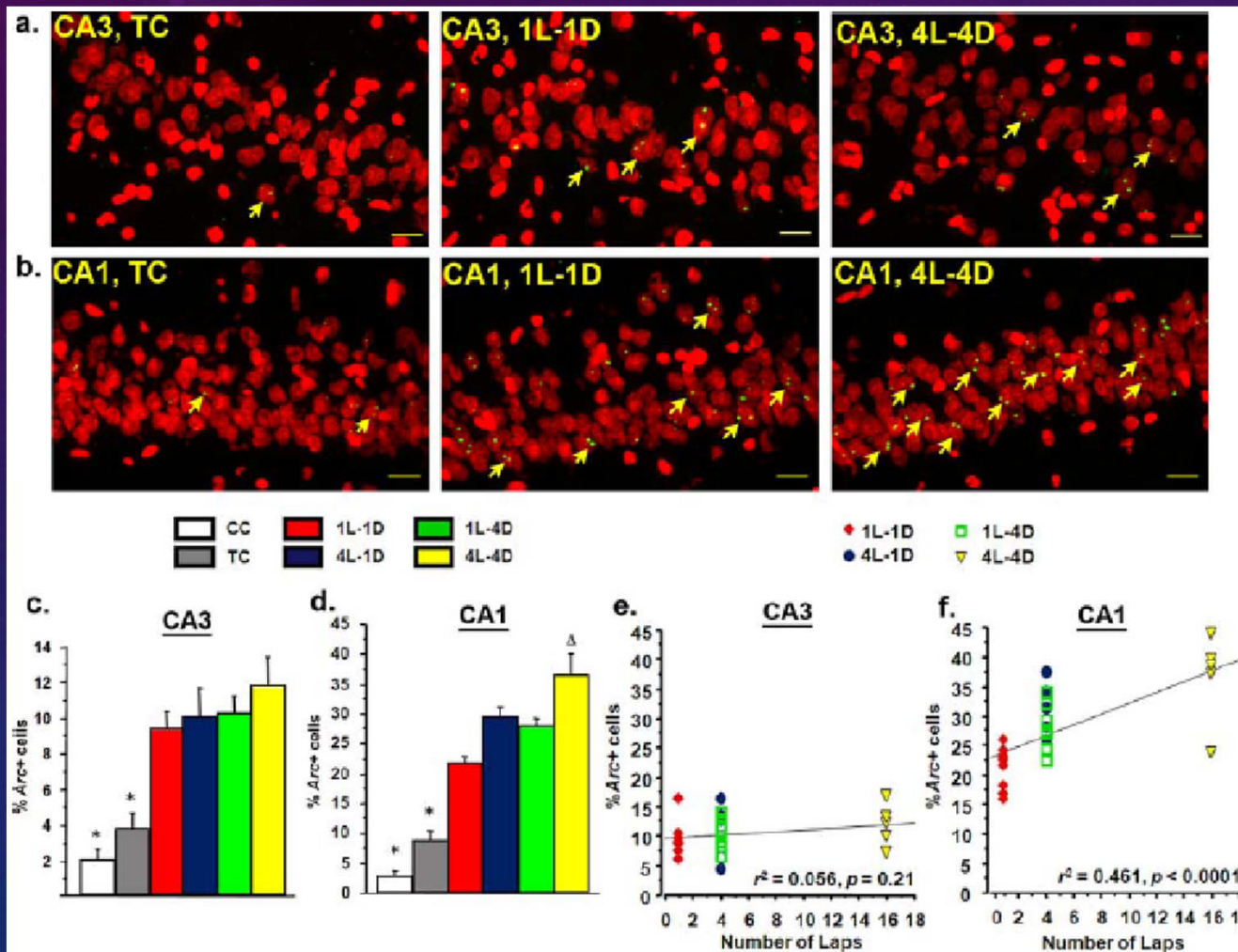
Guzowski et al., 2004, Neuron

VZTAH MEZI OPAKOVÁNÍM NEURONÁLNÍ AKTIVITY A EXPRESÍ *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?

JEDNORÁZOVÁ ZKUŠENOST SPOUŠTÍ EXPRESI ARC V HIPOKAMPU

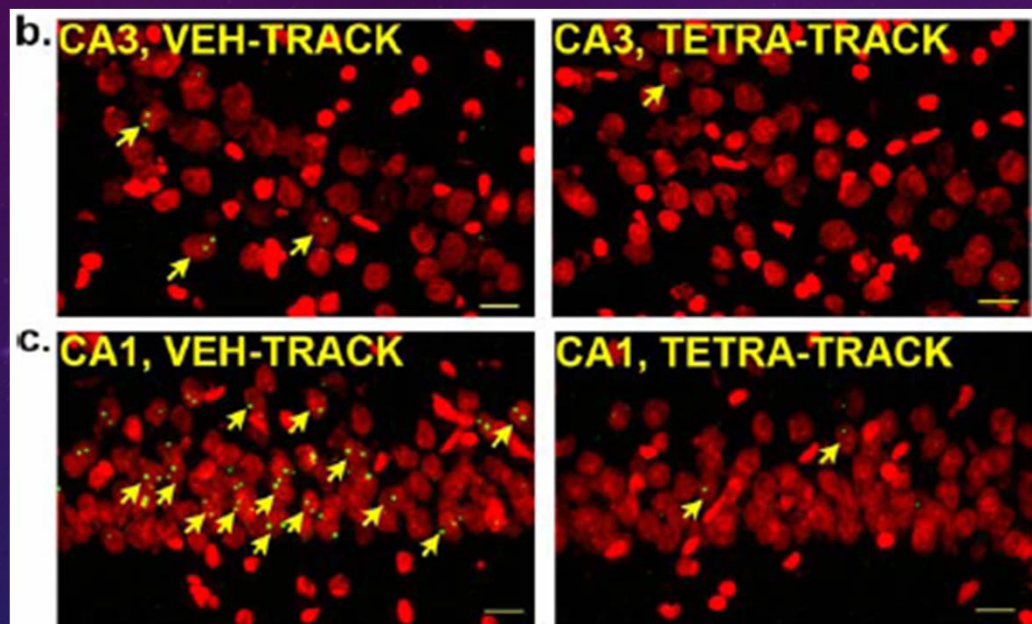


Populace aktivních (*Arc+*) neuronů v CA3 byly víceméně kompletní po jediném kole, zatímco v CA1 populace v dalších kolech dále mírně narůstaly.

Arc je součástí molekulární kaskády od neuronální aktivity k synaptické plasticitě.

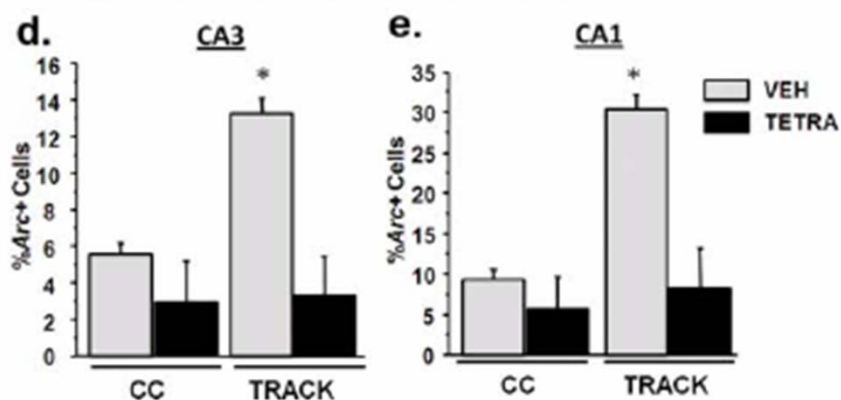
Miyashita et al., 2009, J Neurosci

EXPRESE IEGS MŮŽE BÝT ODPŘAŽENA OD NEURONÁLNÍ AKTIVITY



Inaktivace mediálního septa (MS) narušuje učení a plasticitu v hipokampu, ale prostorově specifická aktivita place cells v CA1 zůstává zachována.

(Mizumori et al., 1989, J Neurosci)



Inaktivace MS eliminuje behaviorálně indukovanou expresi *Arc* v hipokampu.

Miyashita et al., 2009, J Neurosci

POKROČILÉ METODY STUDIA UČENÍ A PAMĚTI

- Elektrofyzologie
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- IEG Imaging
- **Intervenční techniky**
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

INTERVENČNÍ TECHNIKY

- **Permanetní léze**
 - Aspirační
 - Chirurgické
 - Termokoagulační
 - Excitotoxické
 - Selektivní neurotoxiny
- **Dočasné inaktivace – funkční léze**
 - Implantované kanyly pro intrakraniální injekce
 - 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 KO
 - Selective KO
 - Cre recombinase + floxed sequences
 - cell type-specific promoters
 - Inducible KO
 - Tet-O system

POKROČILÉ METODY STUDIA UČENÍ A PAMĚTI

- Elektrofyzologie
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- IEG Imaging
- Intervenční techniky
- **Optogenetika, chemogenetika**
- Clarity - zprůhledňování

OPTOGENETIKA

Stanford Optogenetics Resource Center:

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

Method of the Year: 2010 →
nature methods
Optogenetics

2012
nature
Channelrhodopsin
Crystal Structure →

2010
SCIENTIFIC AMERICAN
Optogenetics Article →

2011 Primer
Cell
Opsin Genomics and
Structure-Function →

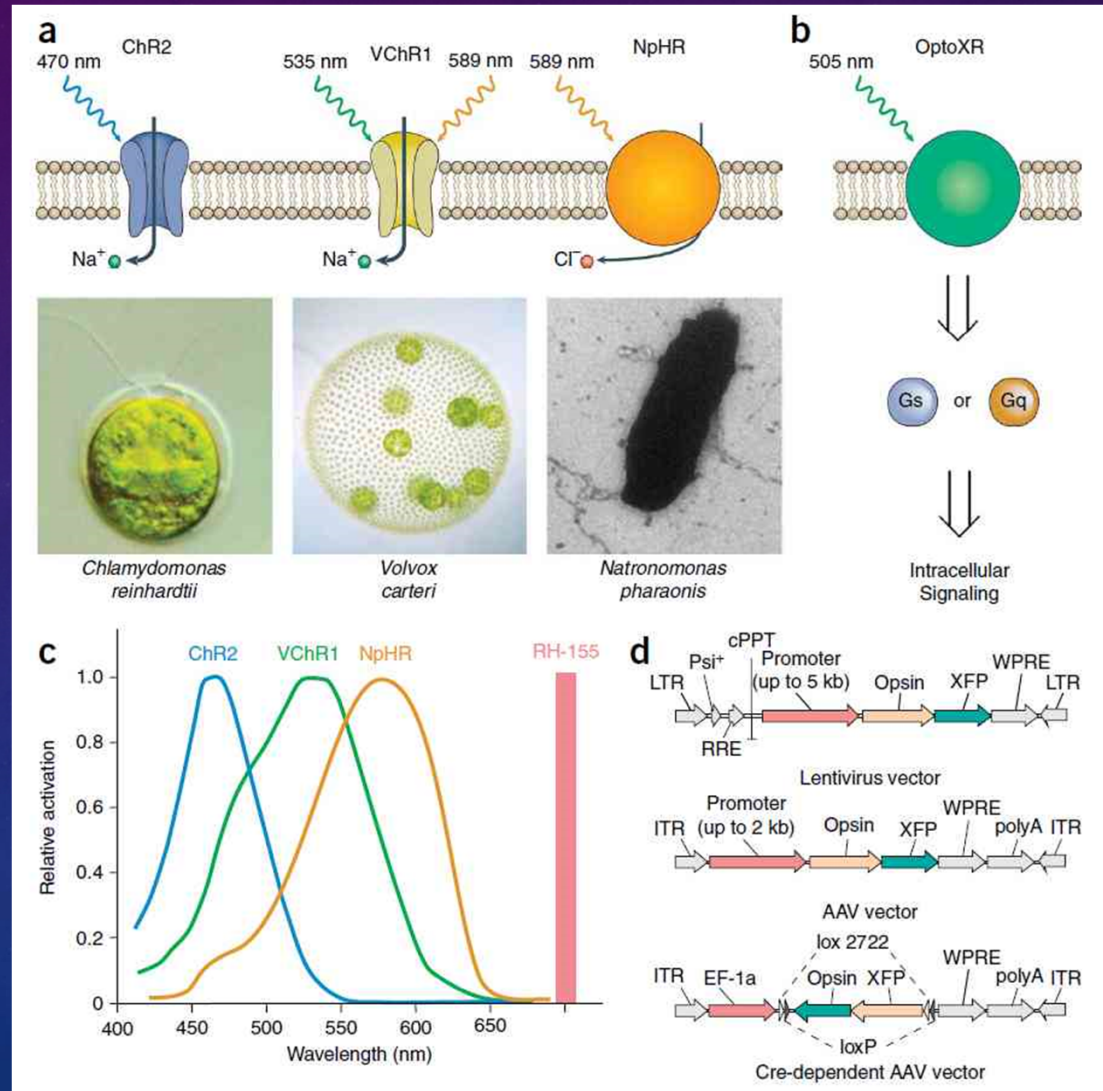
2011 Primer
Neuron
Optogenetics in
Neural Systems →

nature
protocols
optogenetics
protocols →

2012 Analysis
nature methods
Quantitative Opsin
Properties →

OPTOGENETIKA

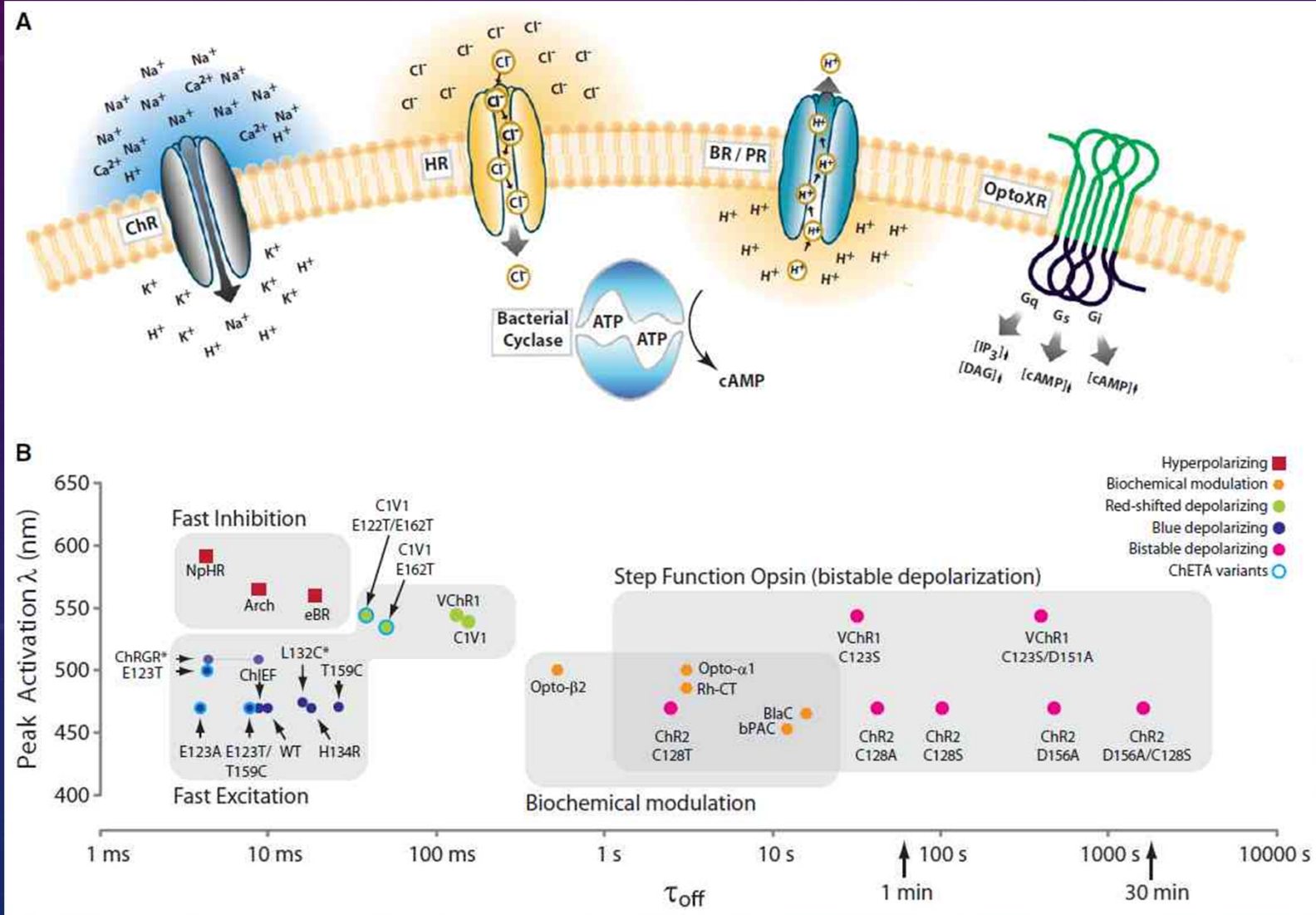
- Kationtový kanál
- Chloridová pumpa
- Světločivný chimerický GPCR
- Kombinace různých vlnových délek
- Virové vektory
- Kombinace s dalšími transgeny (Cre rekombináza, tetracycline transaktivator (tTa))



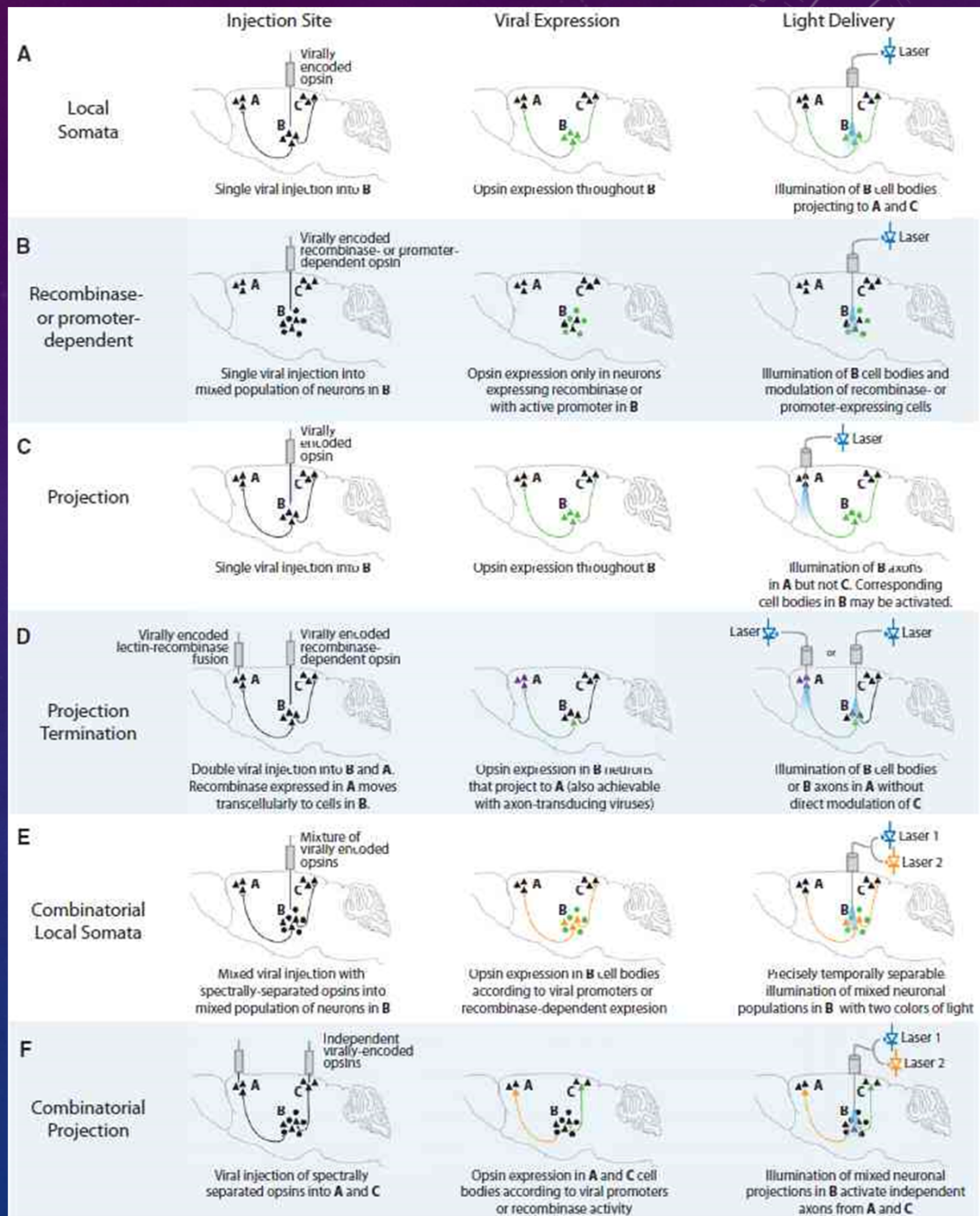
Zhang et al., 2010, Nature Prot

OPSINY

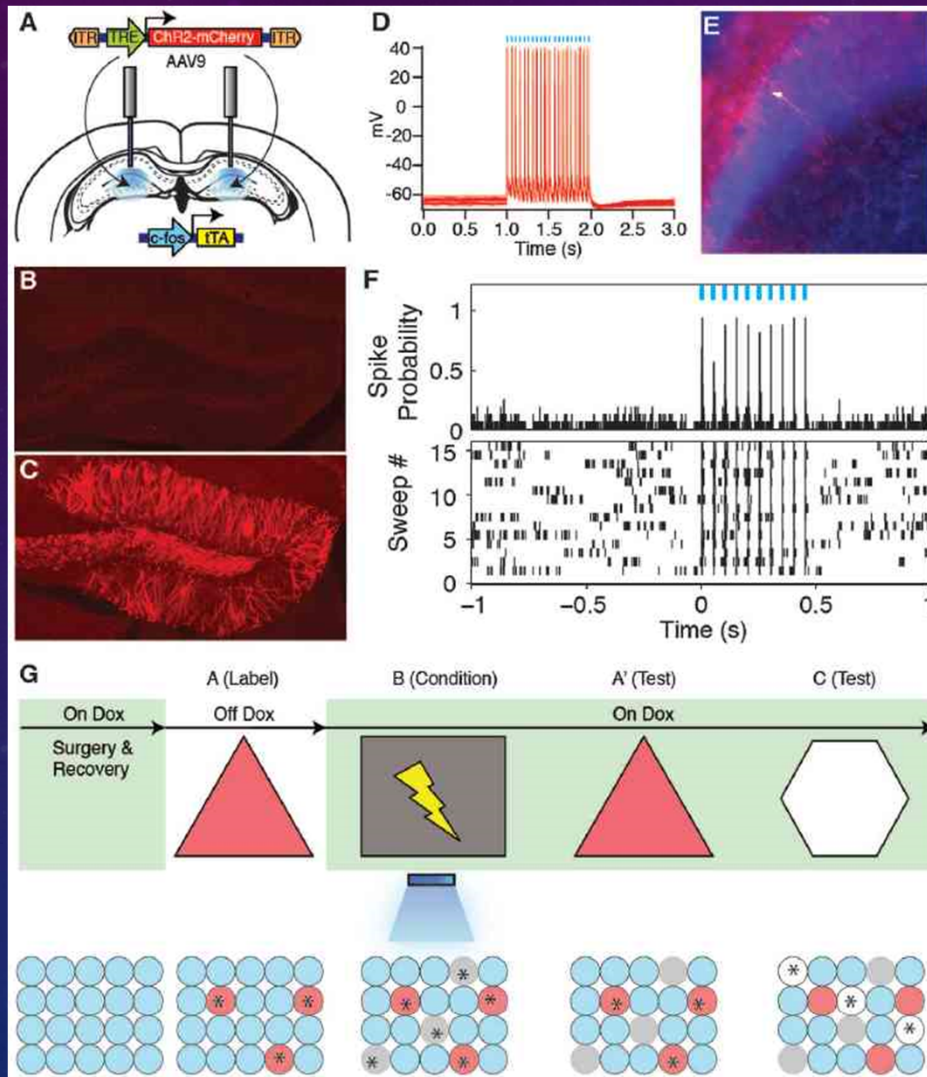
Yizhar et al., 2011, Neuron



TARGETING



CREATING FALSE MEMORIES

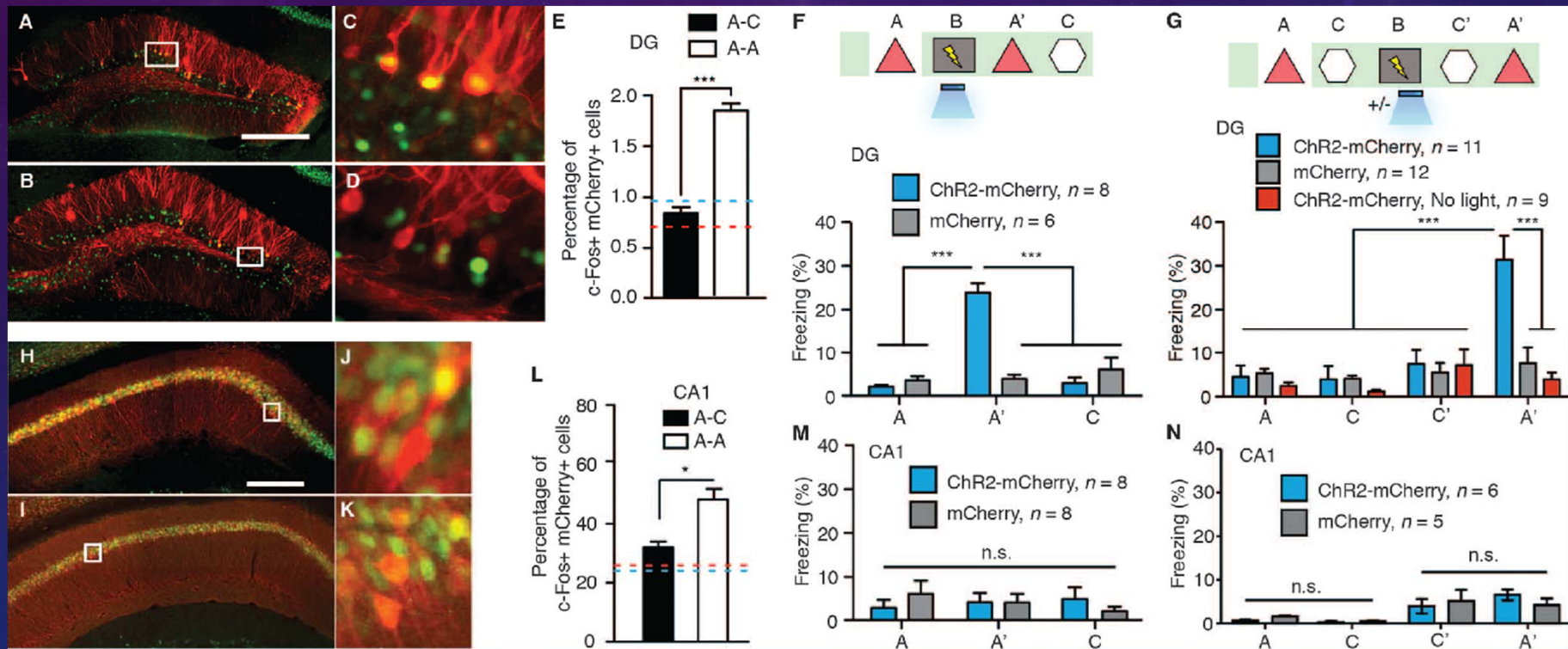


Ramirez et al., 2013,

- Neuronal population encoding Context A is tagged by ChR2.
- The animals receive shock in context B while the tagged population is optostimulated via ChR2.
- This connects the shock with representation of context A.
- Animals will freeze when reintroduced to context A despite never being shocked there

CREATING FALSE MEMORIES

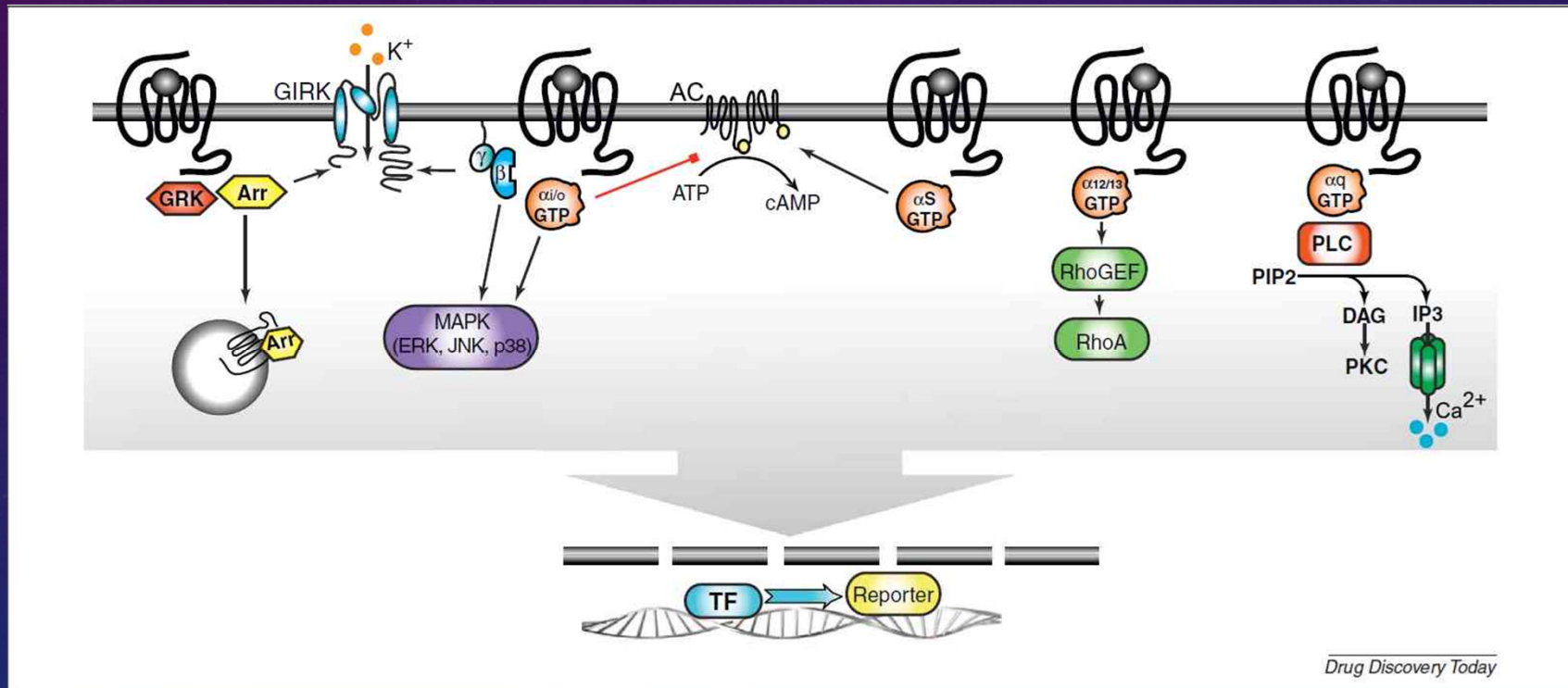
False memories worked in the DG, but not in the CA1.



Ramirez et al., 2013,
Science

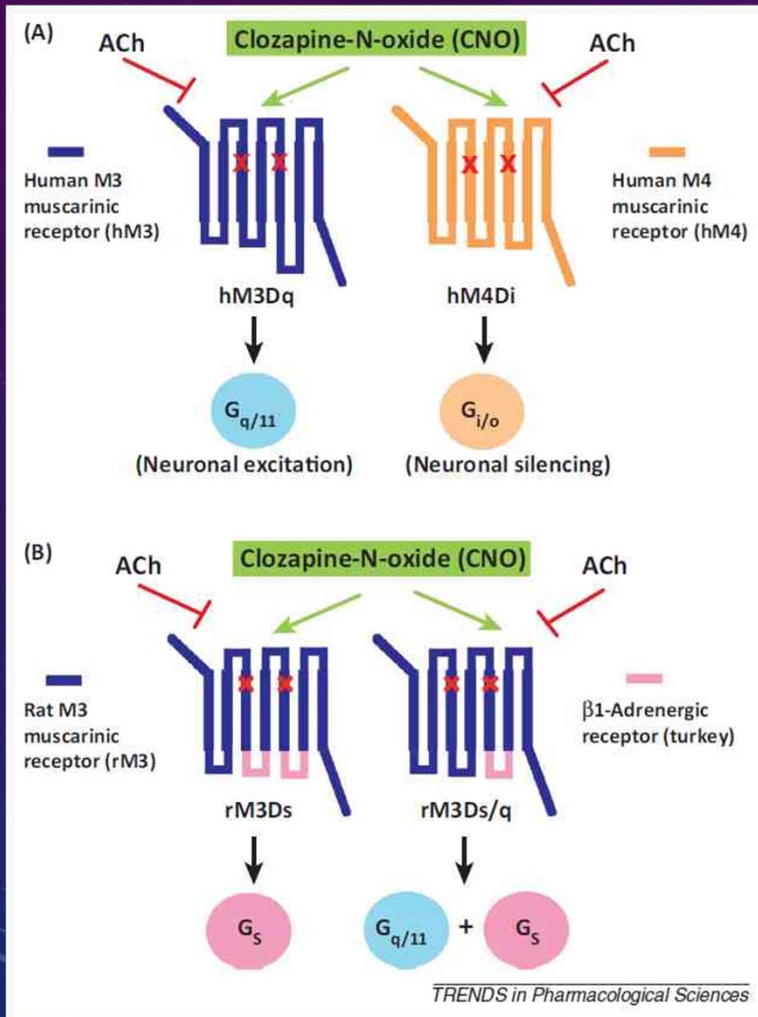
CHEMOGENETIKA - GPCR

G-protein-coupled receptors

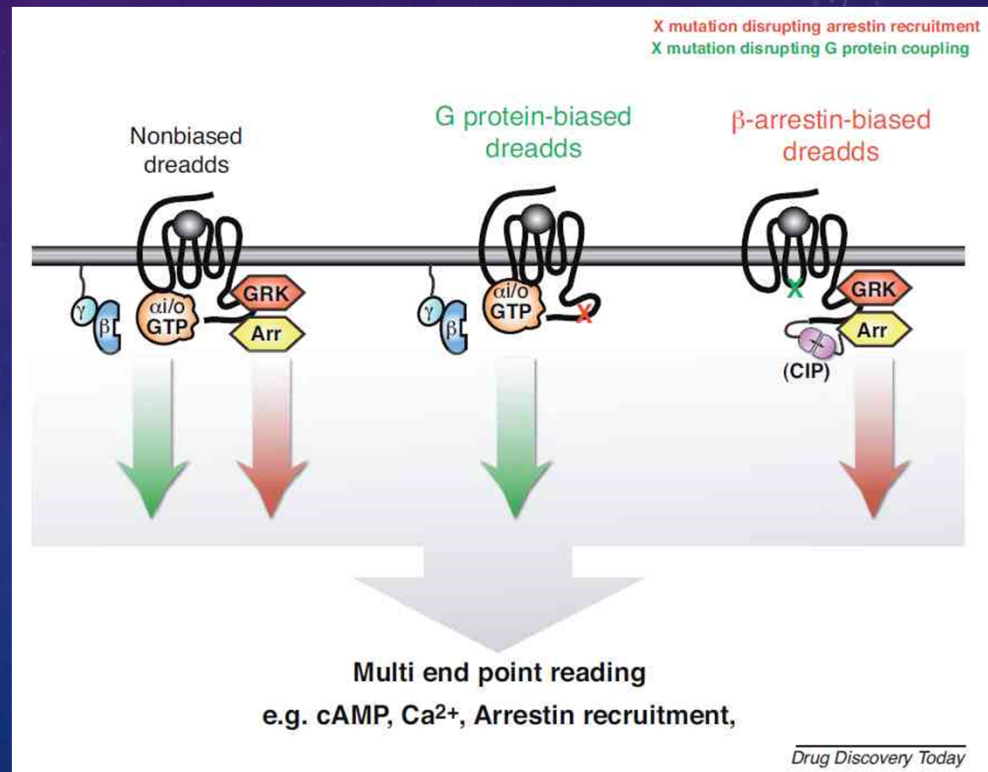


Lee et al., 2013, Drug Discov Today

CHEMOGENETIKA - DREADDS

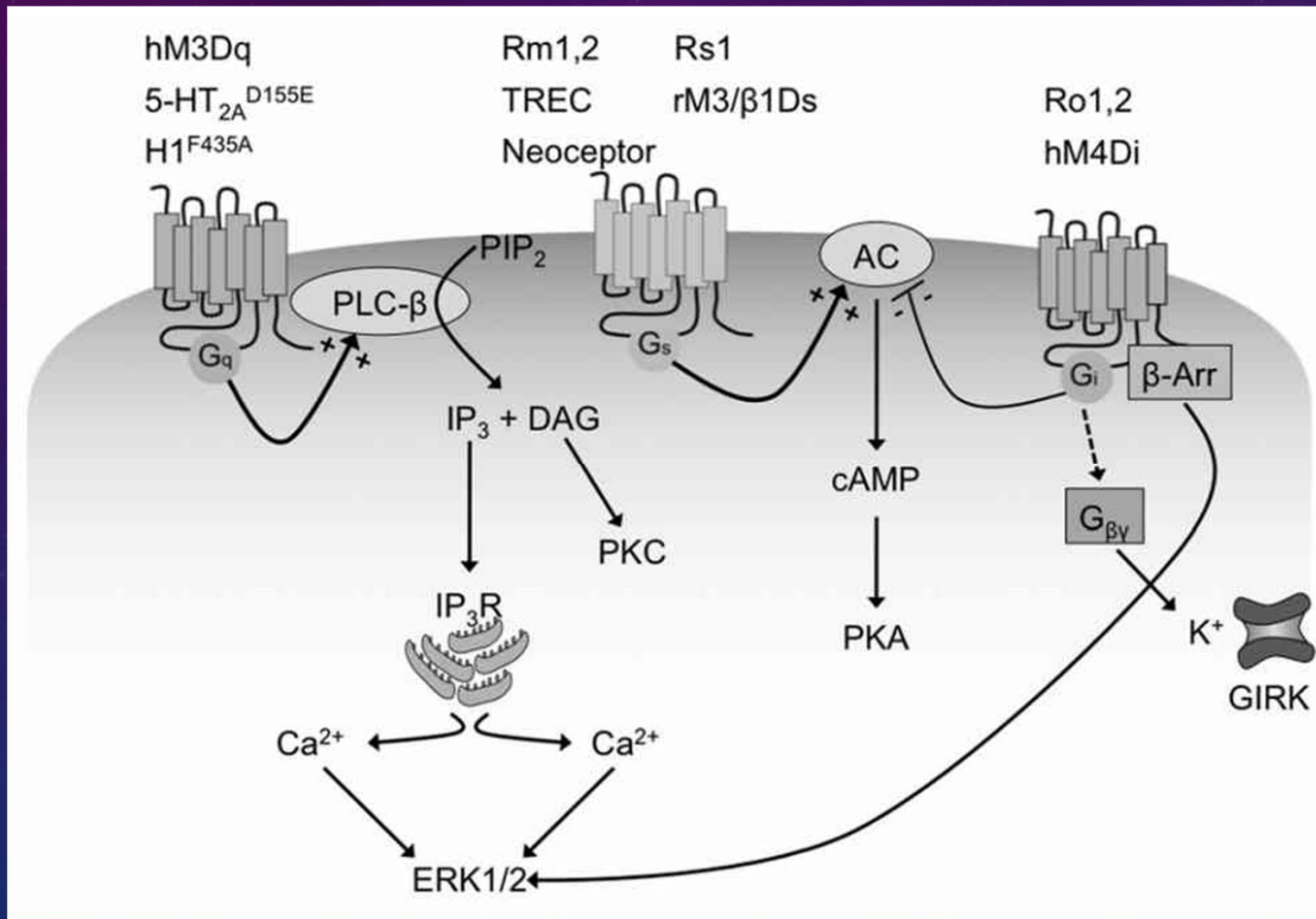


Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs
CNO (Clozapine-N-Oxide)



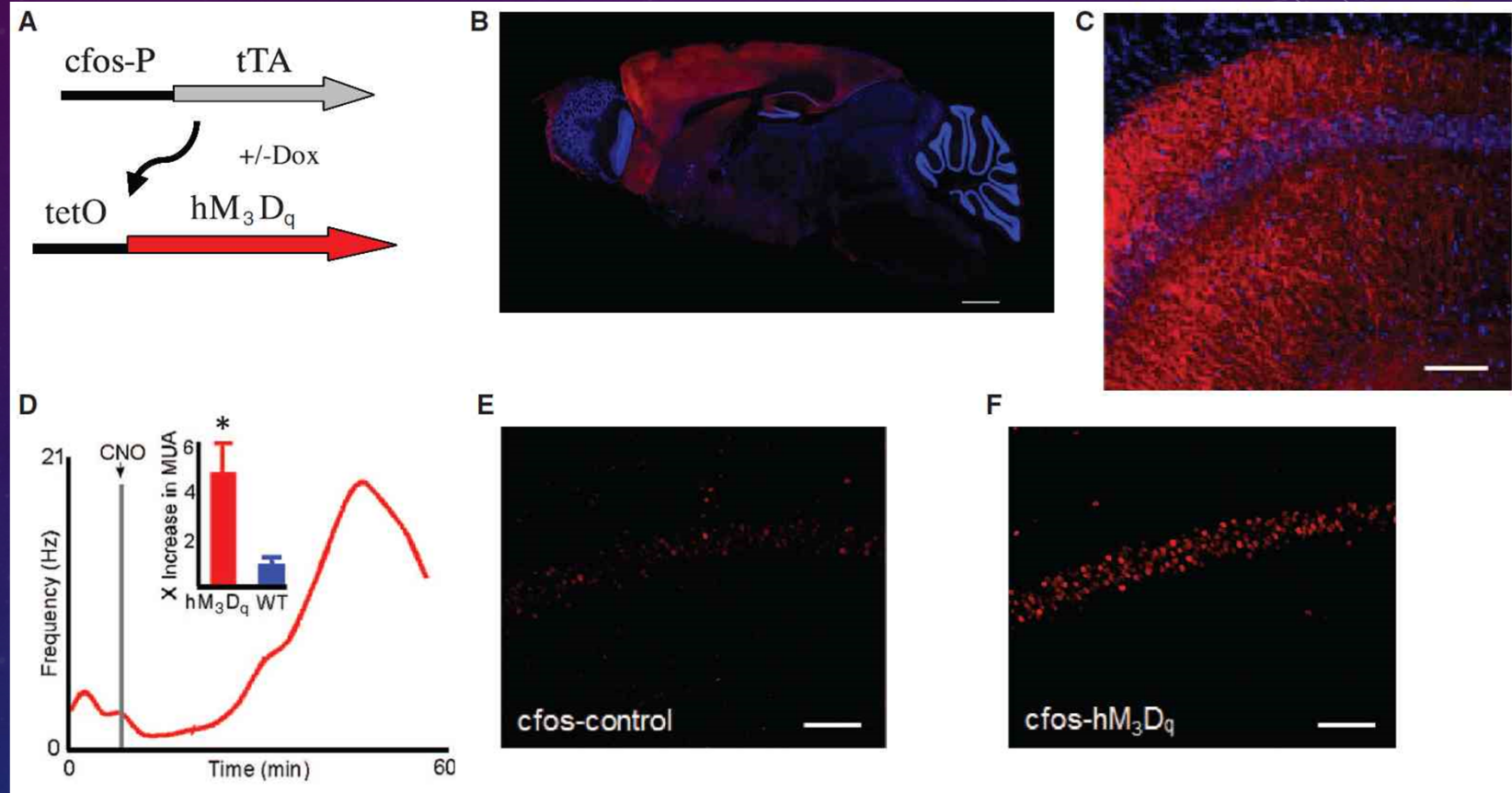
Wess et al., 2013, Trends Pharm
Sci

HM3DQ - HM4DI



Dong et al., 2010, Mol Biosyst

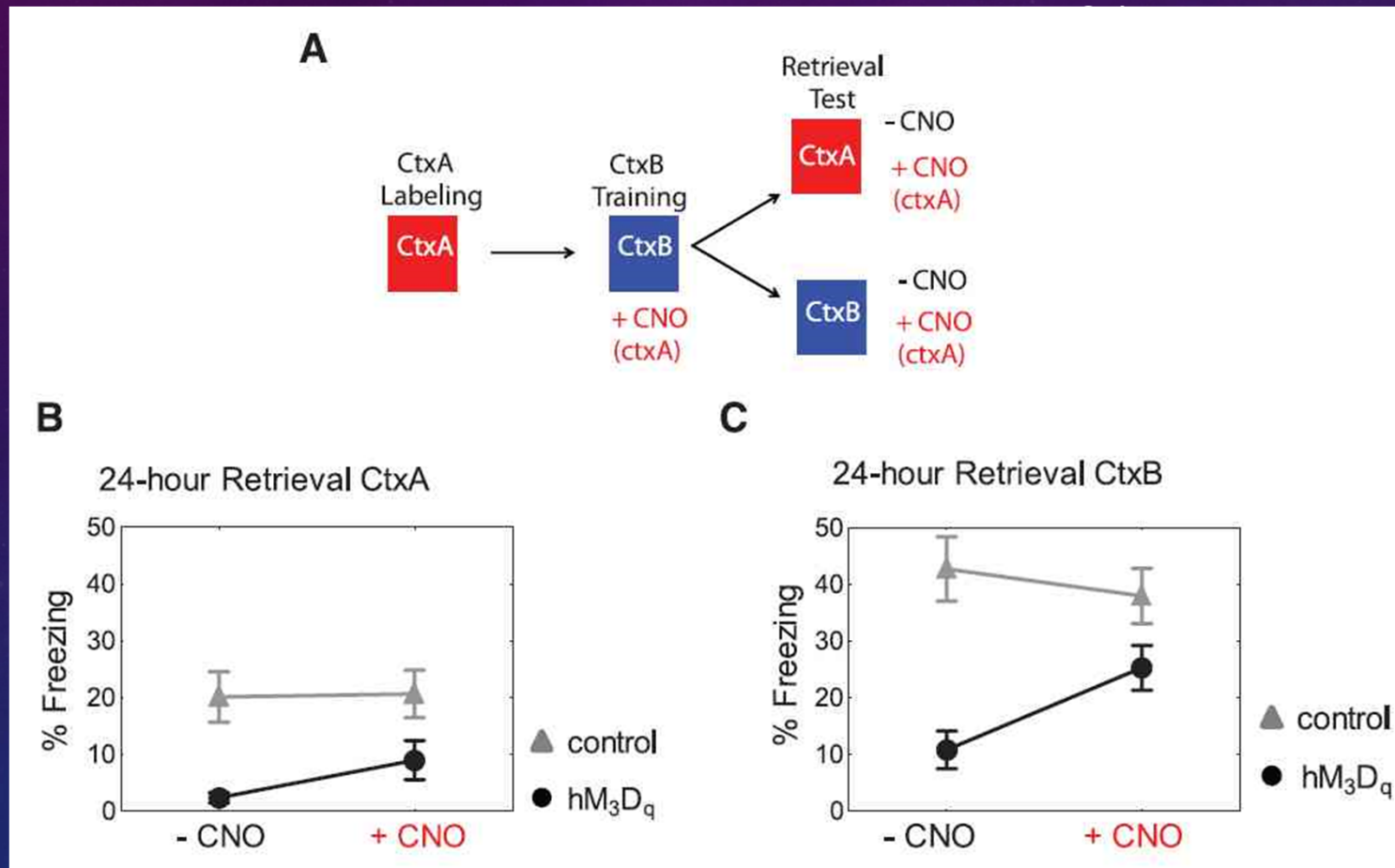
AKTIVACE HM3DQ



Garner et al., 2012,
Science

SYNTHETIC MEMORY TRACE

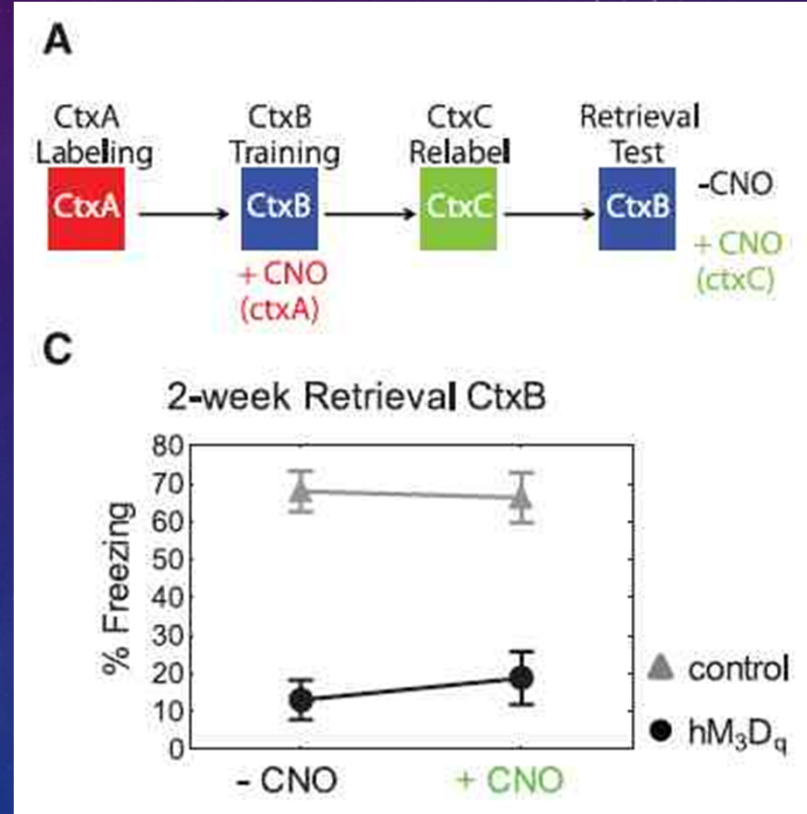
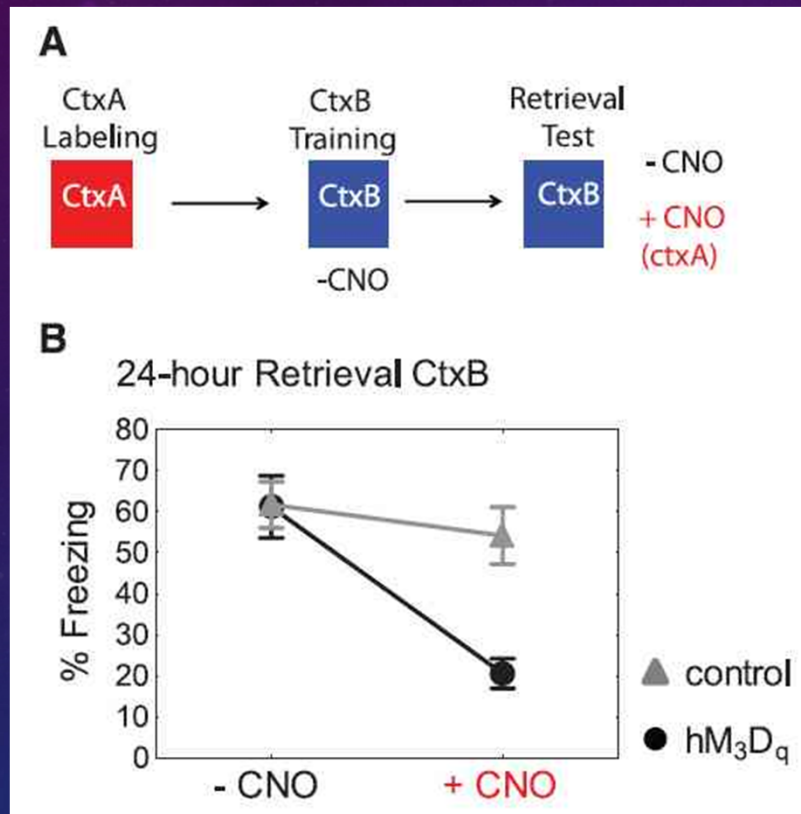
Garner et al., 2012,



Activating representation of a neutral Ctx A during conditioning in Ctx B interferes with freezing during test in Ctx B unless representation of Ctx A is stimulated

SYNTHETIC MEMORY TRACE

Garner et al., 2012,

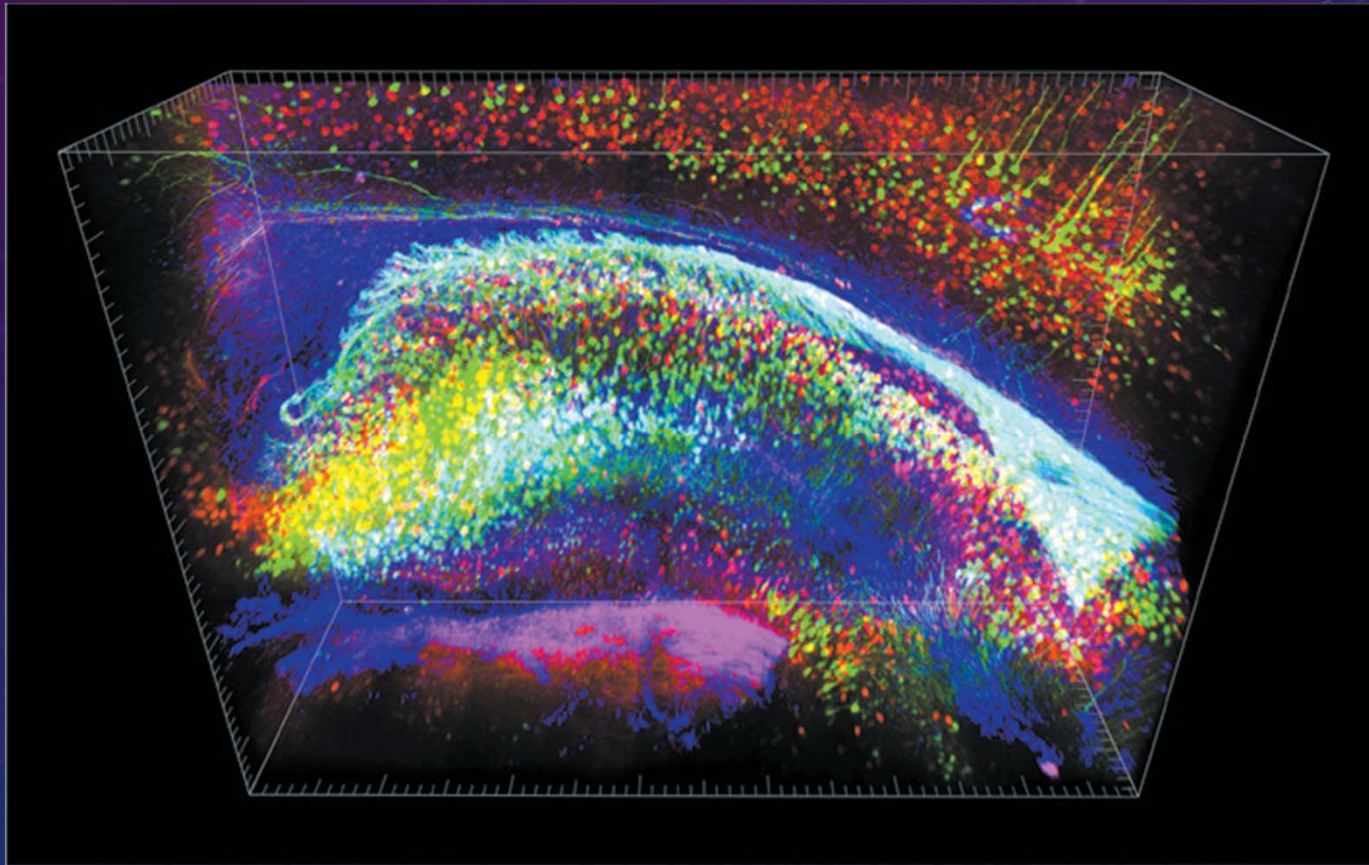


Activating a representation of a neutral Ctx A during test blocks freezing in conditioning Ctx B.

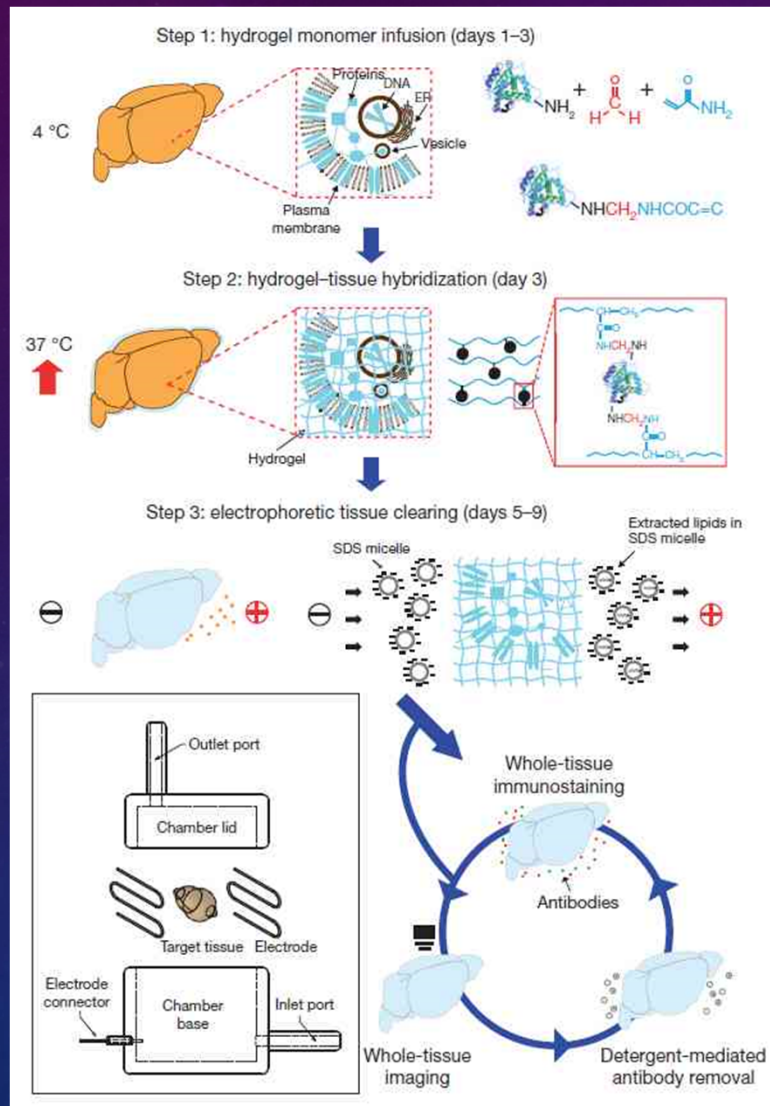
POKROČILÉ METODY STUDIA UČENÍ A PAMĚTI

- Elektrofyzologie
 - In vitro
 - In vivo
 - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- IEG Imaging
- Intervenční techniky
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

CLARITY



CLARITY ~ „ODMAŠŤOVNA“

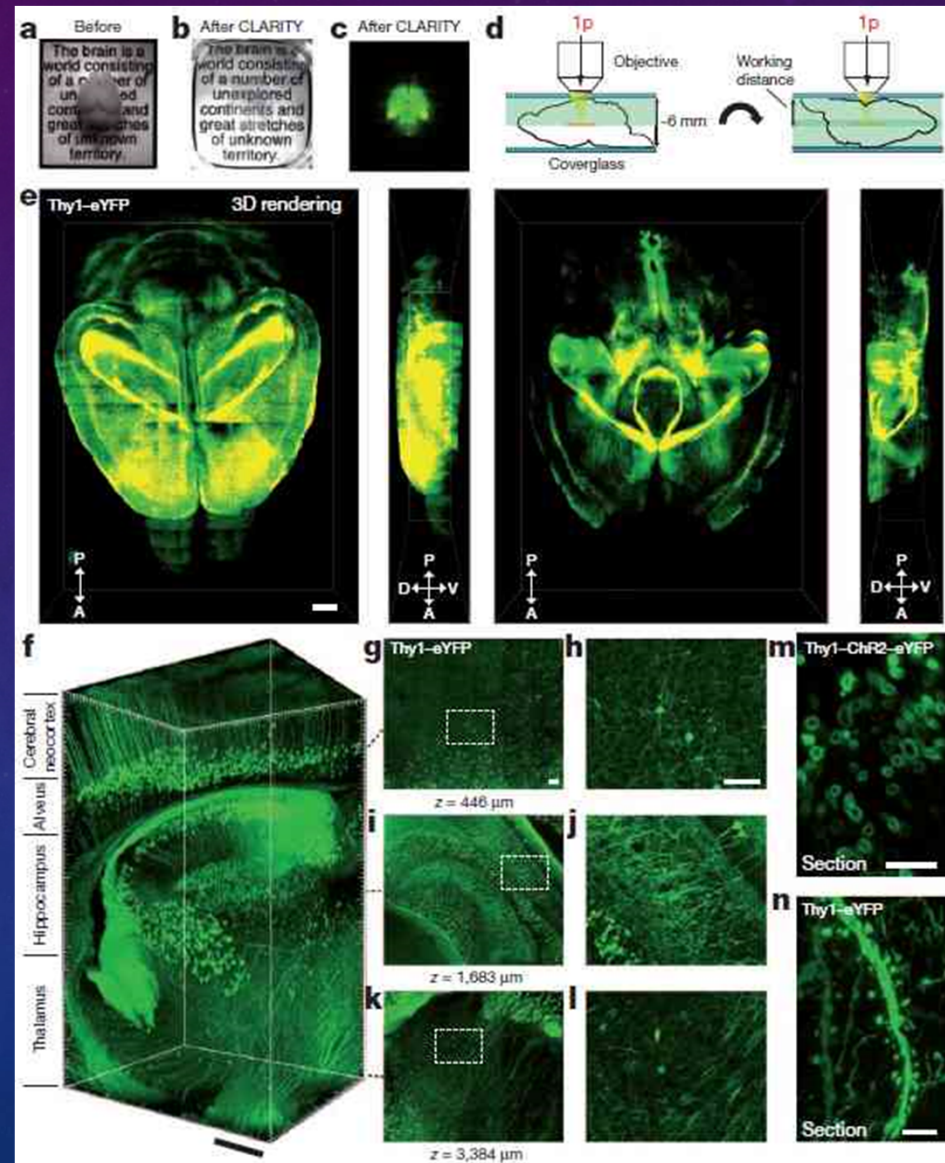


- Hlavní překážkou šíření světla tkání jsou lipidy.
- Jejich odstranění po předchozí fixaci hydrofilních biomolekul v hydrogelové mřížce zprostupňuje též tkáň/vzorek pro makromolekuly (protilátky apod.).

Cheng et al., 2013,
Nature

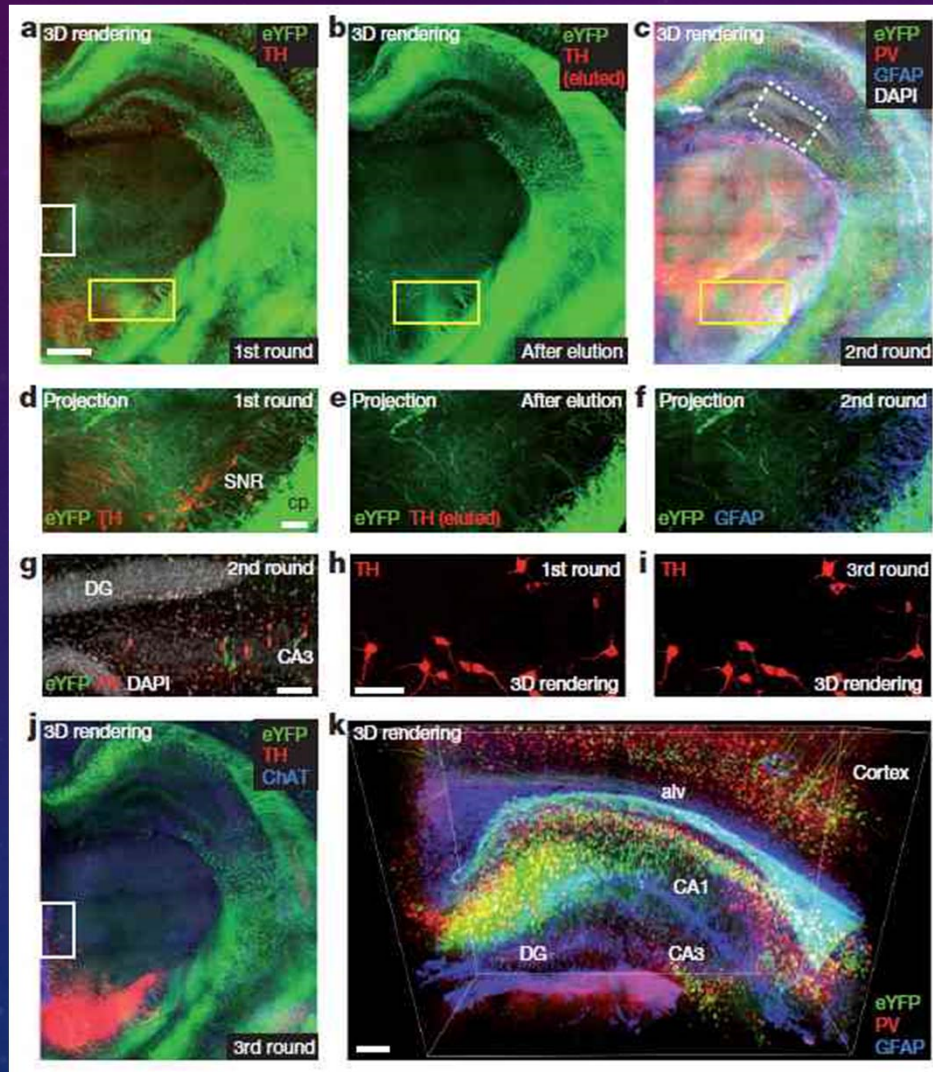
CLARITY

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



Cheng et al., 2013,
Nature

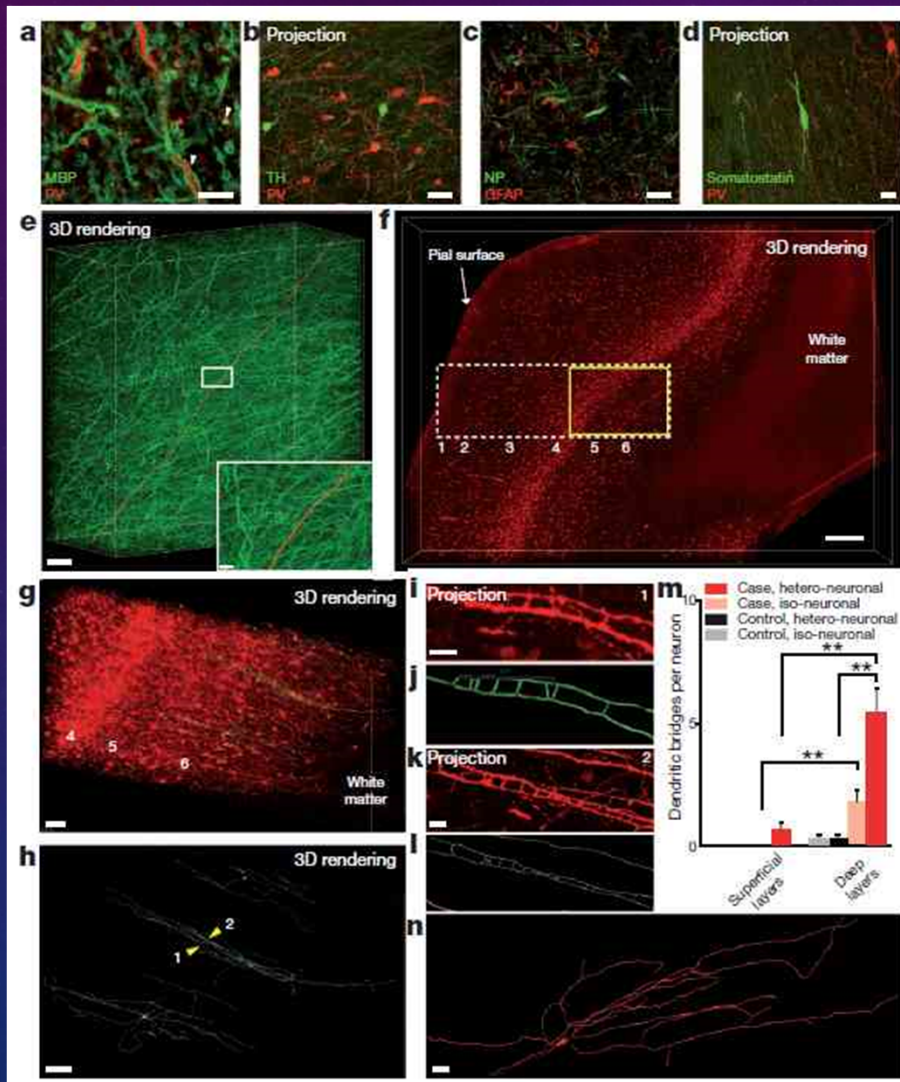
CLARITY



- Clarity umožňuje opakované barvení – skutečně trvalý preparát

Cheng et al., 2013,
Nature

CLARITY



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

Cheng et al., 2013,
Nature

DĚKUJI ZA POZORNOST!

ŠTĚPÁN KUBÍK & ALEŠ STUHLÍK



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

<http://natur.cuni.cz>

/



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

/



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

Z