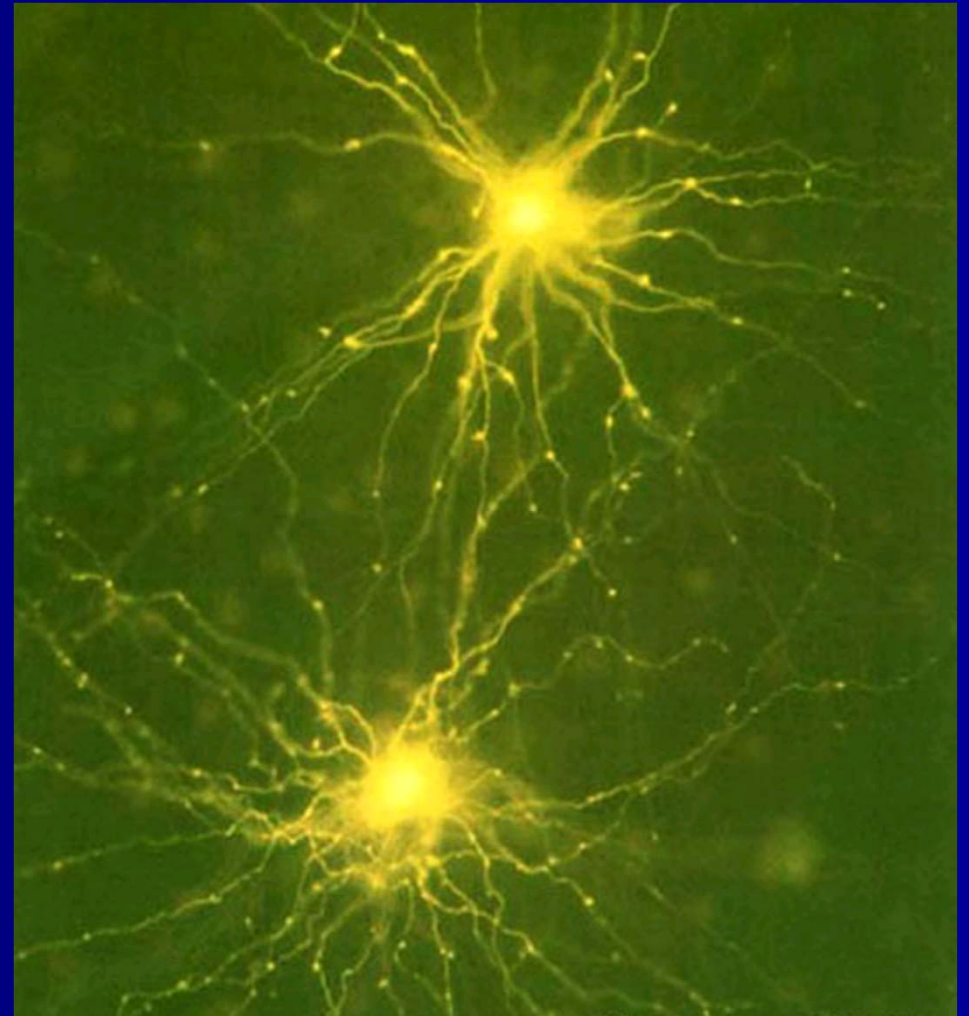


Mechanismy paměti

Co se dozvíme dnes?

- 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

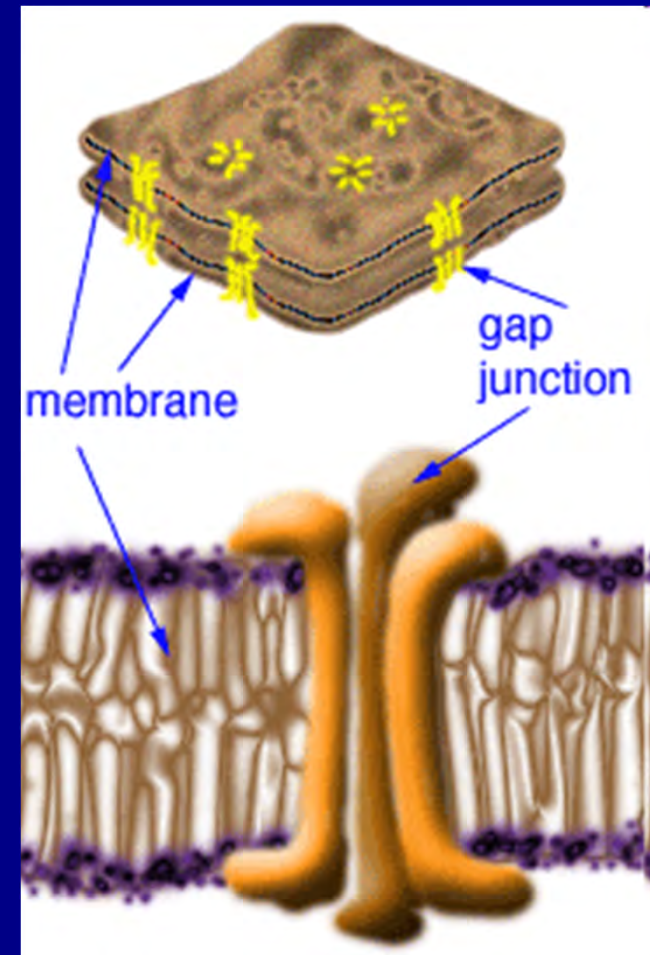
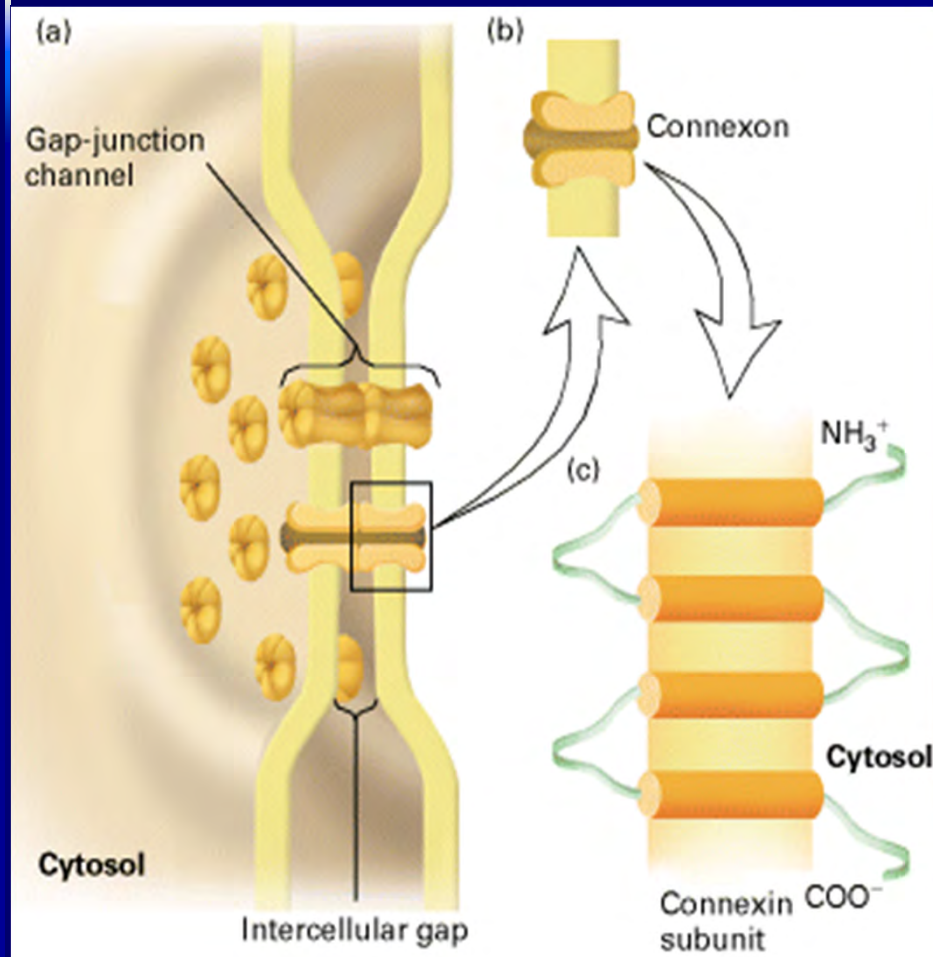
- **We consider learning to be an adaptive change in behavior caused by experience**
- **Memory refers to the internal storage and recall of previously learned behaviors. (Forgetting is the loss of storage or recall.)**
- **Modifikace chování má svůj základ v plastických změnách v činnosti nervových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

Synapse

Synaptická spojení

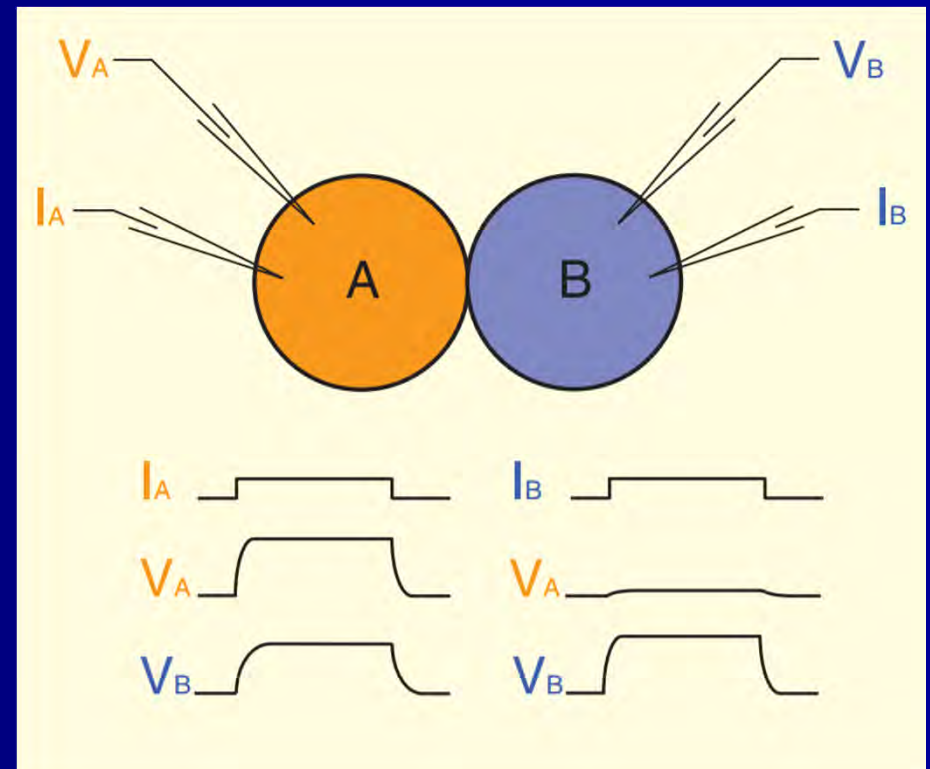
- Chemická synapse - příklad nervosvalové spojení – dochází zde k výlevu neuropřenašeče
- Elektrická synapse – *gap junction* – elektrický signál přechází z jedné buňky na druhou - konexinové můstky, v CNS na neuronech, glii, hojně u bezobratlých
- Synaptická plasticita – dobře doložená na chemických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

Elektrická synapse – *gap junction* *štěrbínovité spojení*



Elektrická synapse – štěrbinovité spojení

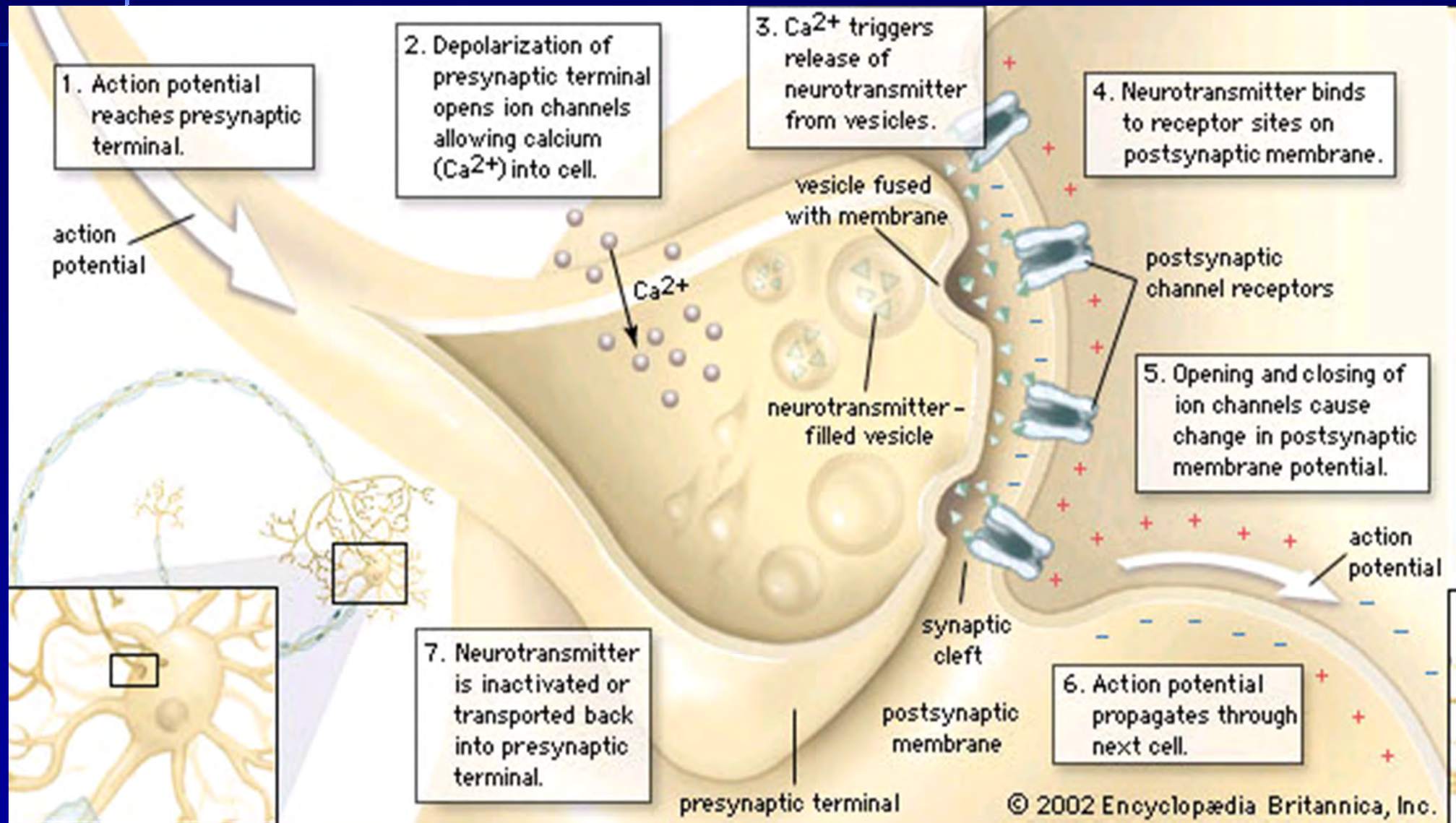
- **Přímé nízkoodporové elektrické propojení dvou buněk – H₂O, ionty, malé molekuly**
- - z toho vyplývá – absence synaptického zpoždění, typického pro chemickou synapsi.
- Méně mechanismů pro plasticitu
 - Avšak existují usměrňující *gap junctions*, pro které je vodivost v jednom směru podstatně vyšší 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 haptēin“ – 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, SNAP proteiny atd.)**
- **Kvantový obsah (uvolněný počet kvant),**
- **Kvantová velikost (počet molekul v kvantu)**
- **Difúze neuropřenašeče skrze štěrbinu, vazba na postsynaptické receptory.**
- Odpověď

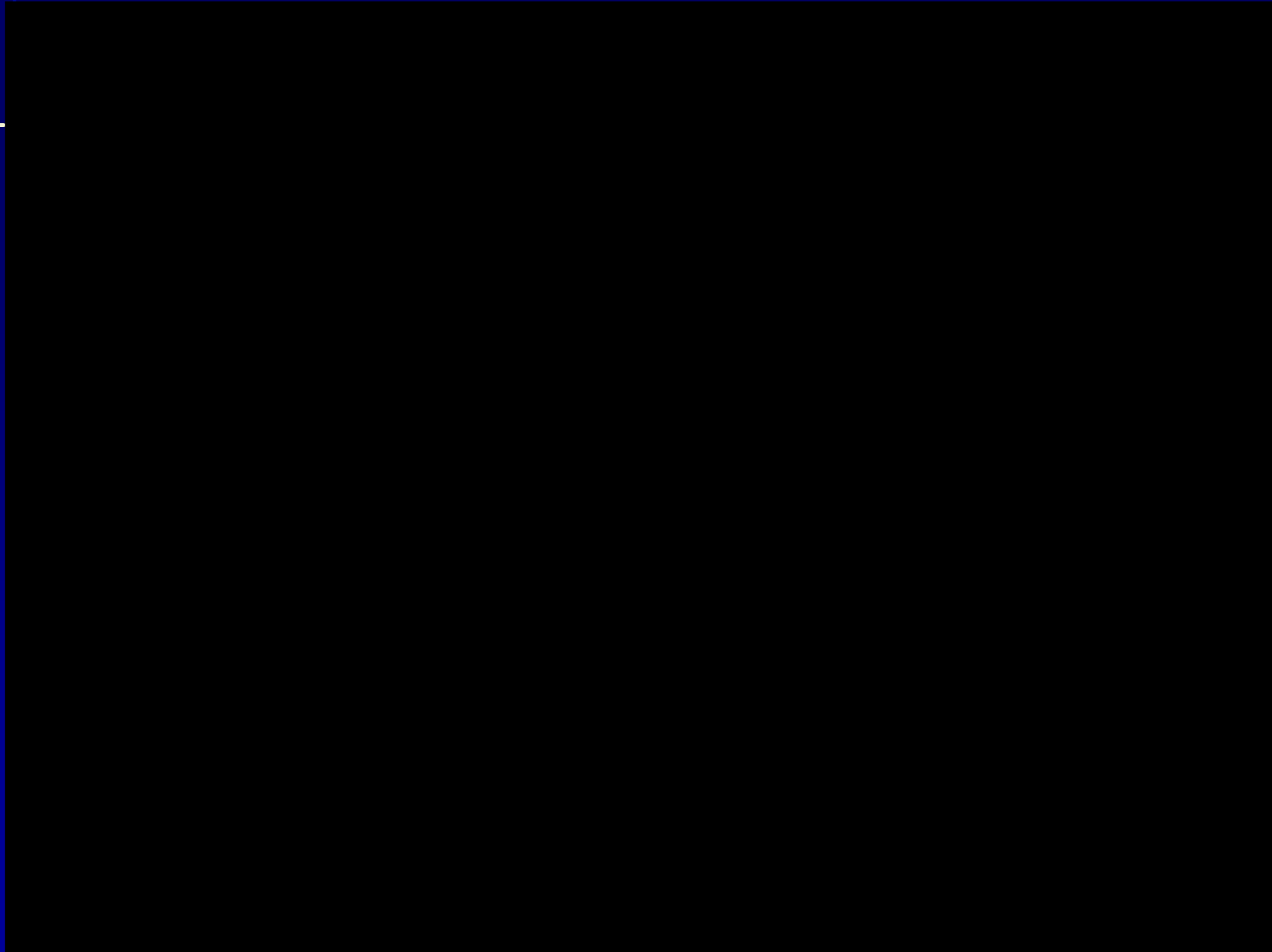
Nervosvalové spojení jako modelová chemická synapse

- 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, kontrainsulter ATP, postsynapticky 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) – občasné spontánní výlev jednoho kvanta – vyvolá na svaly 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

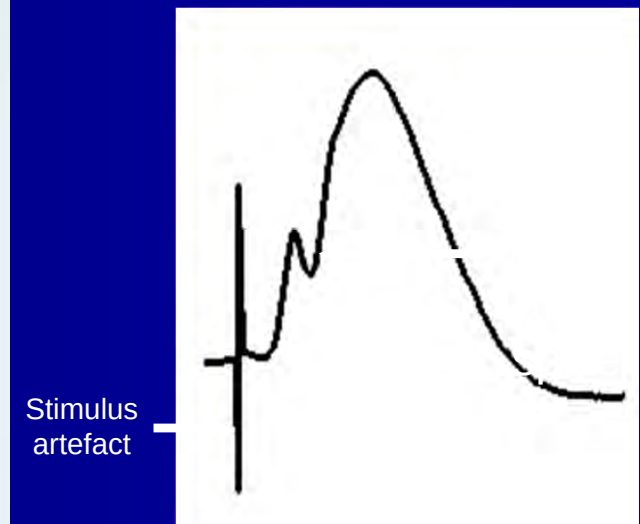
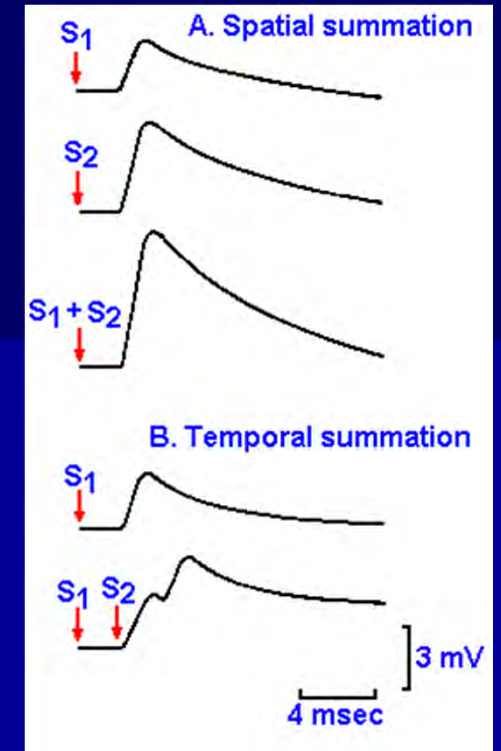
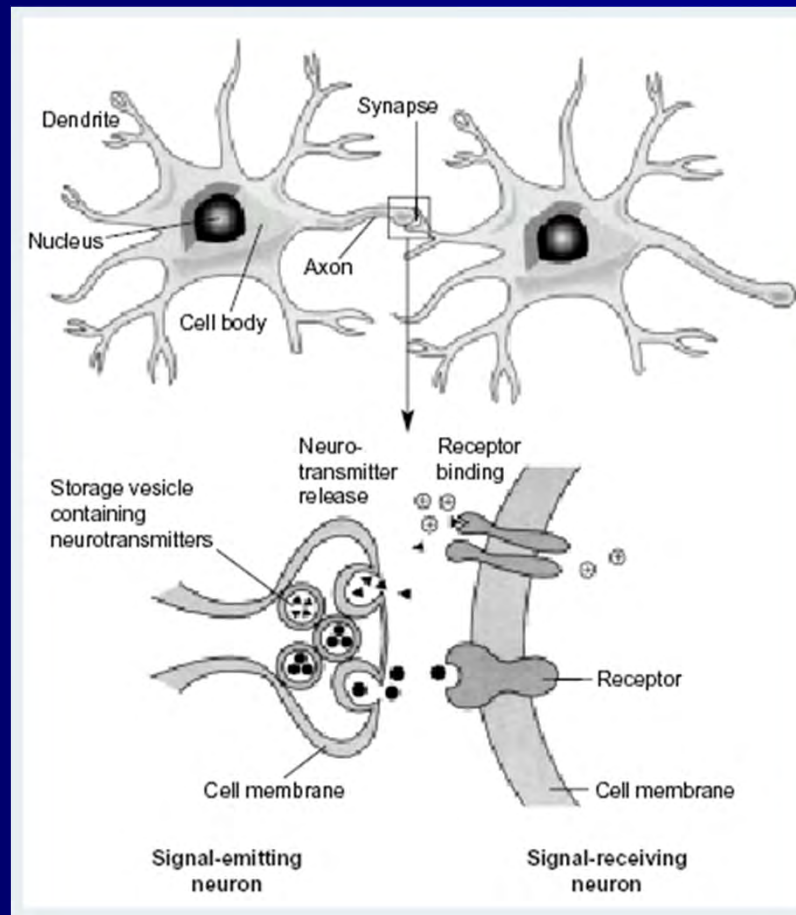


Chemické synapse v CNS

- 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**



A population field potential ("EPSP") evoked in the dentate gyrus

Synaptická plasticita

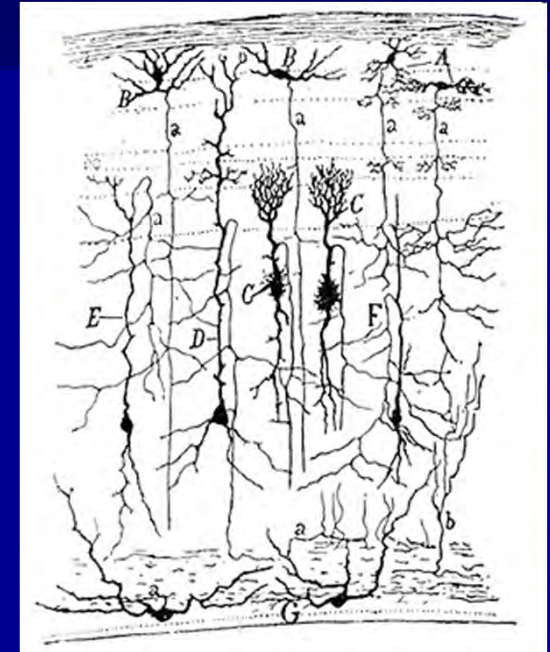
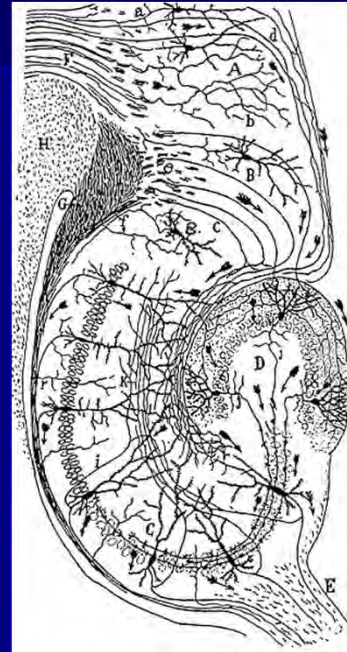
- Je pravděpodobně mechanismem, jakým jsou uchovávány informace v paměti.
- Mohla by být podkladem nejen učení a paměti, ale i dlouhodobějších vzorců chování.
- Plasticita má význam patrně i v drogové závislosti a např. i dlouhodobé a neuropatické bolesti
- Je přístupná experimentálnímu zkoumání, dá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

Synaptická plasticita

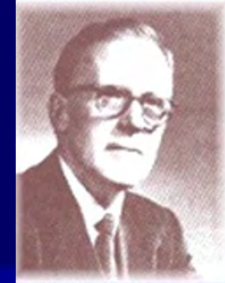
- **Synaptická plasticita je definována jako schopnost synapse změnit svoji synaptickou sílu (*synaptic strength*) v závislosti na vlastní aktivitě**
- **Synaptická síla**
 - je míra změny postsynaptického potenciálu evokovaného aktivací presynaptického zakončení a následným výlevem neuropřenašeče.
 - 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.**
- **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..**

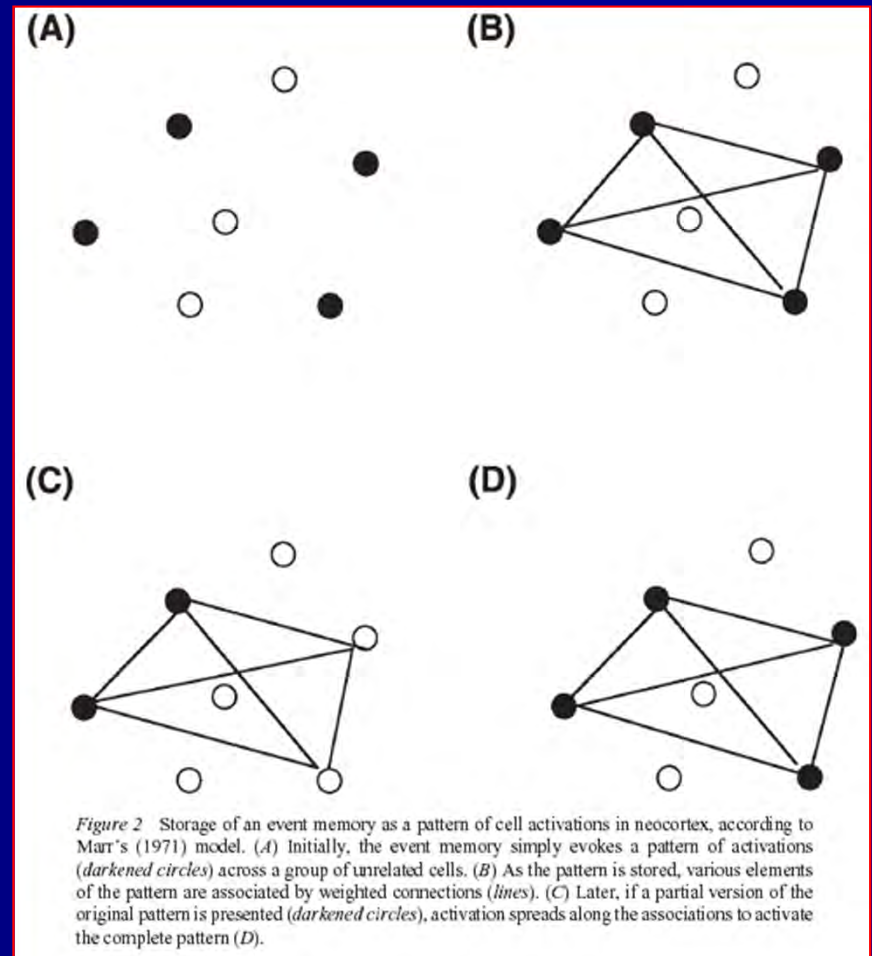
Marrův model formace archikortikálních stop (1971)

David Courtnay Marr (1945-1980) – britský neurobiolog a psycholog, zabýval se především viděním.

V r. 1971 navrhnul **autoasociativní model archikortikální (hipokampální) reprezentace paměti**, kdy aktivované neurony vytvářely vzájemná spojení na základě zvýšení synaptické účinnosti a následně po vytvoření sítě stačila aktivace části buněk k obnovení funkce celé sítě.

Model založen na modifikaci synaptických spojení pomocí zkušenosti, umožňoval vybavení paměťové stopy i na základě částečné informace.

Model se stal východiskem pro mnoho hypotéz o funkci hipokampu, z nichž některé byly potvrzeny.



"Simple memory: a theory for archicortex." Phil. Trans. Royal Soc. London, 262:23-81 (1971)

Mechanismy synaptické plasticity

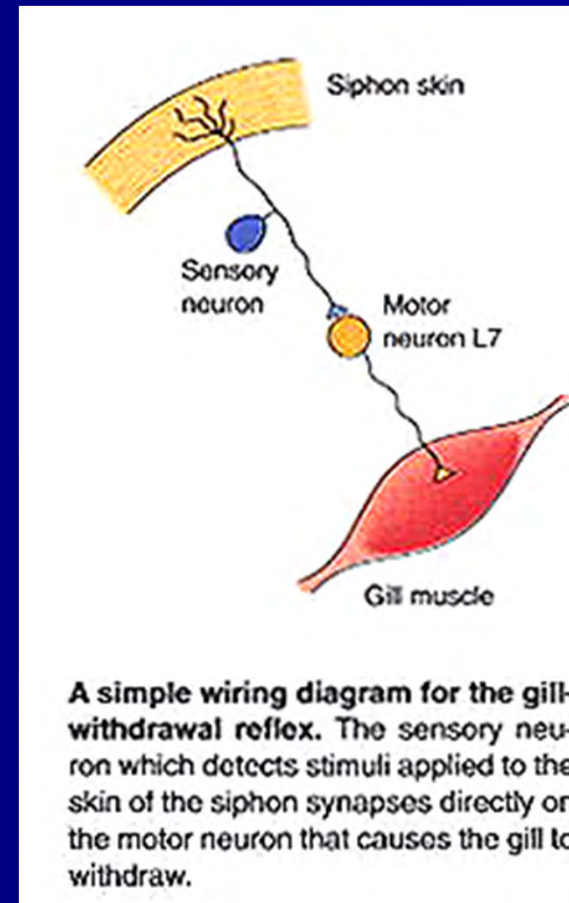
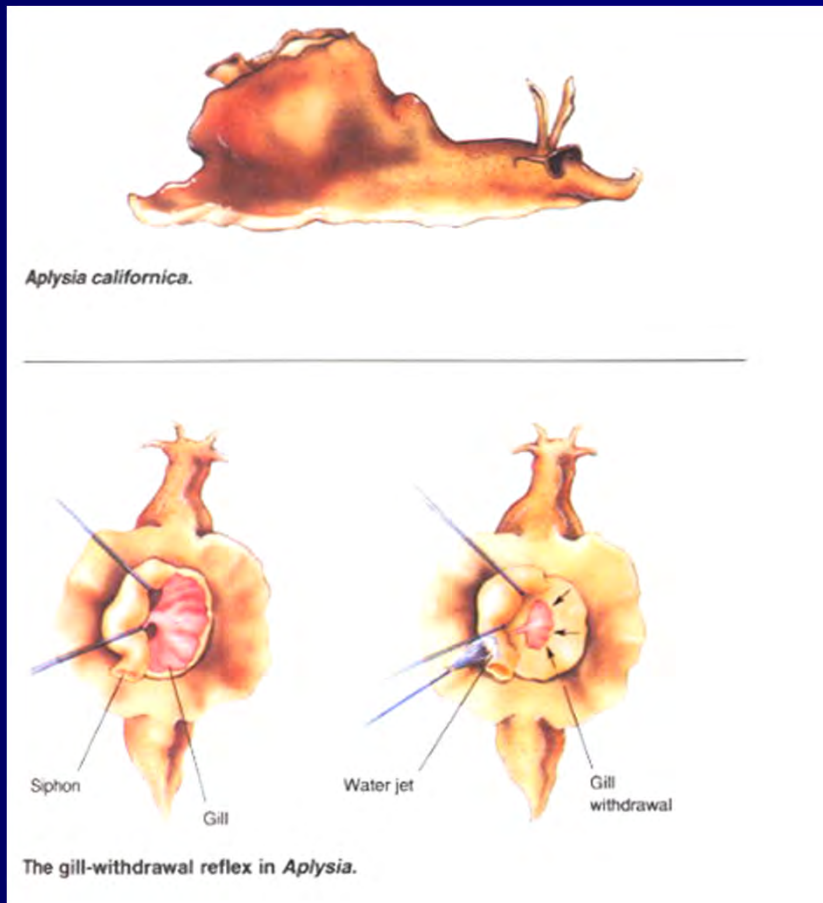
**Mechanismů, které vedou k synaptické plasticitě, je mnoho.
např.**

- 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

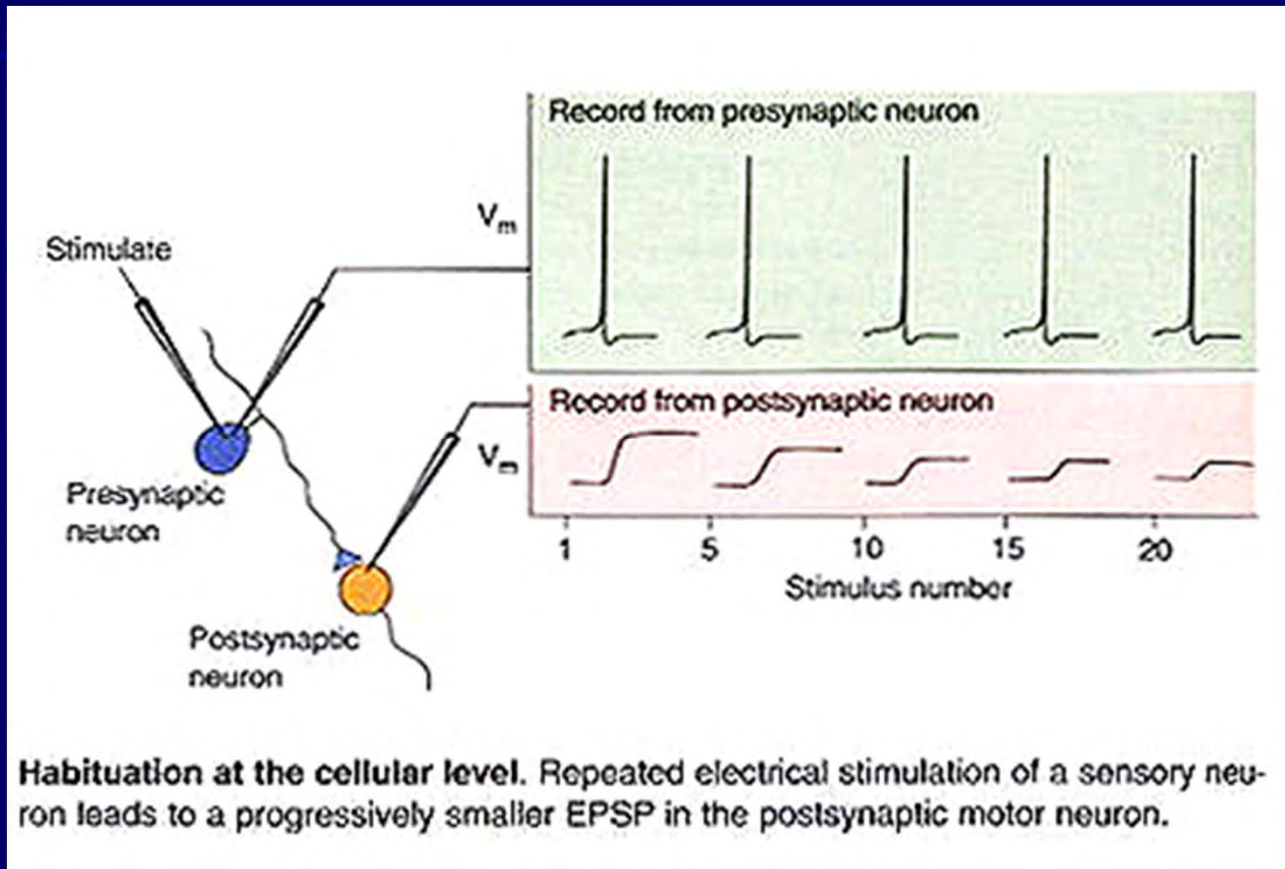
Studium syn.plasticity u jednoduchých organismů - *Aplysia californica*

- 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 senzorickým neuronem (LE mechanosenzorem), který je synapticky spojen s postsynaptickým motorickým neuronem (L7) inervujícím žábry

Mechanisms of simple learning in the sea slug (*Aplysia*)

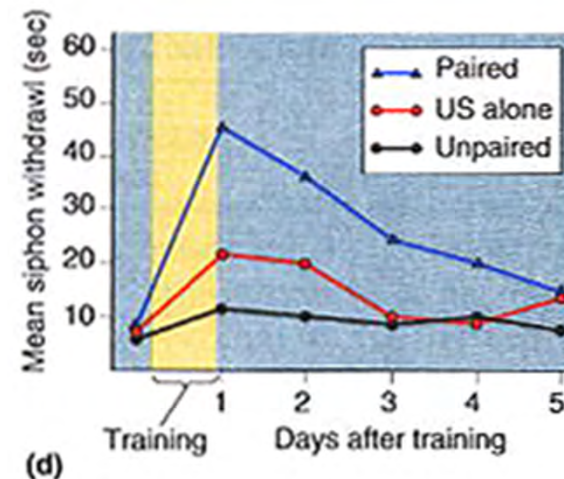
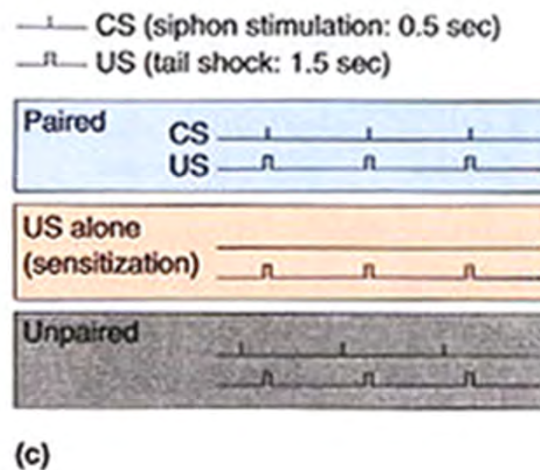
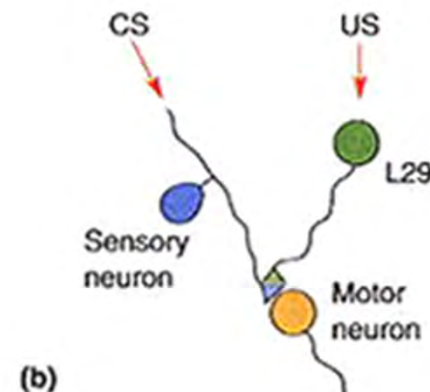
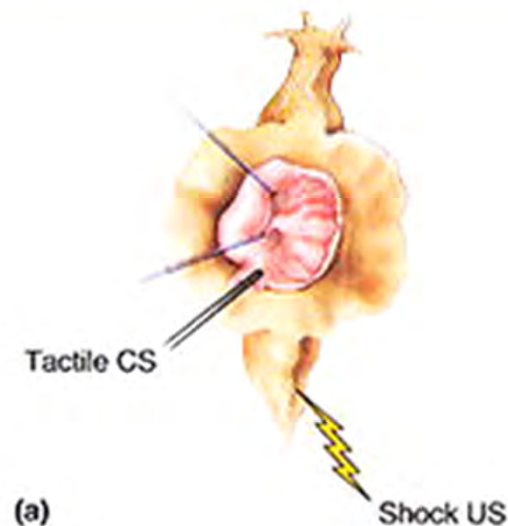


Habituace zatahovacího reflexu žaber u Aplysie



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

Klasické (pavlovovské) podmiňování zatahovacího reflexu sifonu u Aplysie

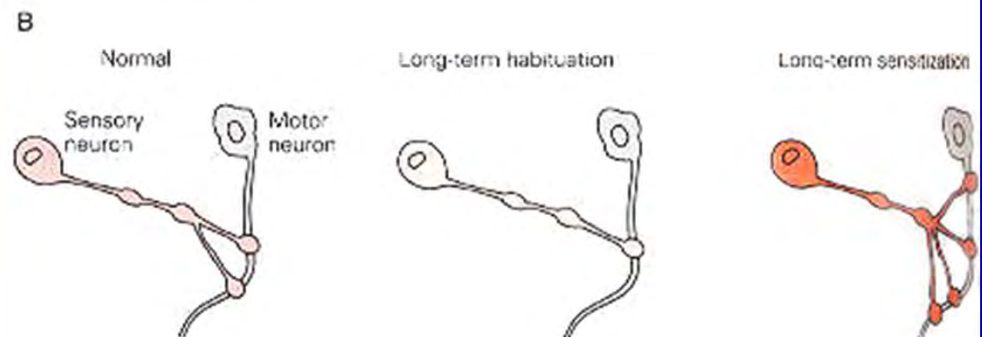
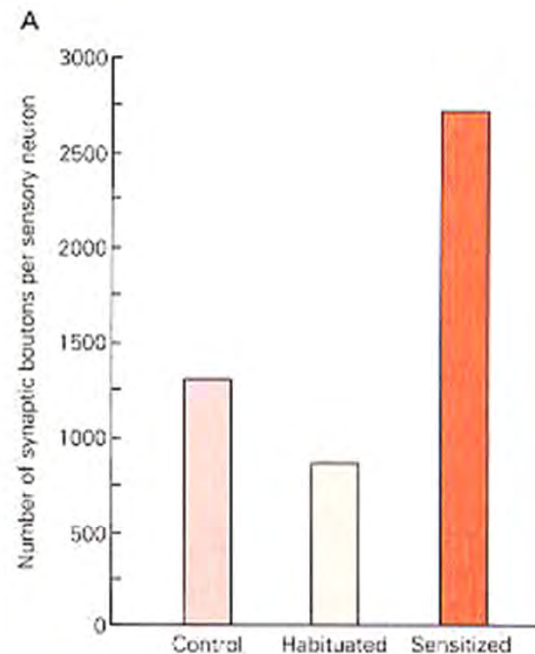


Synaptické změny v důsledku učení u Aplysie

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

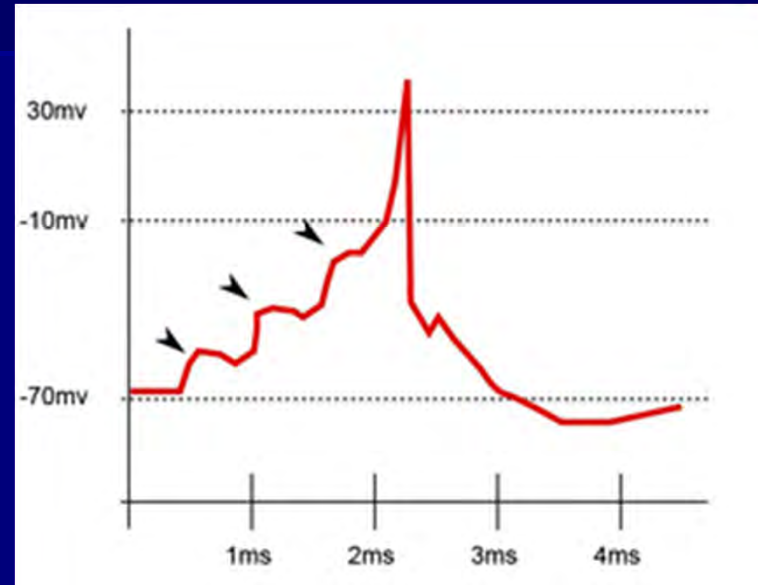
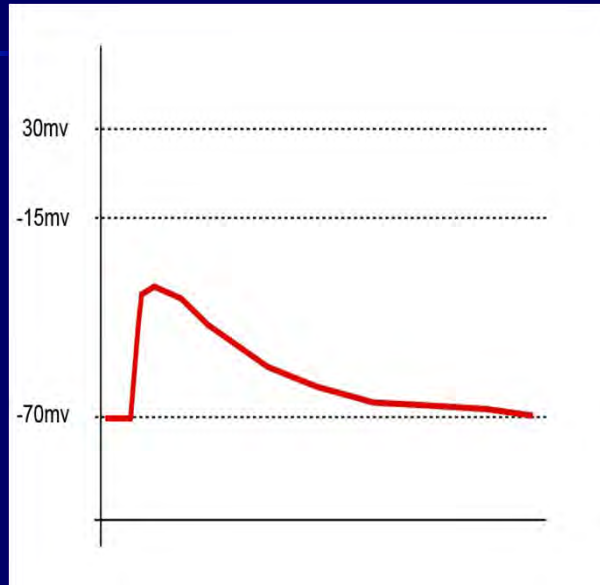
- *Hawkins, R.D., Clark, G.A., & Kandel, E.R. (2006). Operant Conditioning of Gill Withdrawal in Aplysia. The Journal of Neuroscience, 26, 2443-2448.*
- Pokud Aplysie povolila žábry po určité hranici, byla „potrestána“ mírným šokem do ocásku.
- Zvířata se naučila operantně zatahovat žábry, aby se vyhnula potrestání.
- Vzhledem k tomu, že neurony inervující struktury, které se tohoto chování účastní, jsou již identifikovány, otevřelo to 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;18(2):108-17.*

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 uchovávání paměťových stop.
- **Dlouhodobá potenciace a dlouhodobá deprese – LTP a LTD – horčí kandidáti na neurální substrát učení a paměti**



EPSP

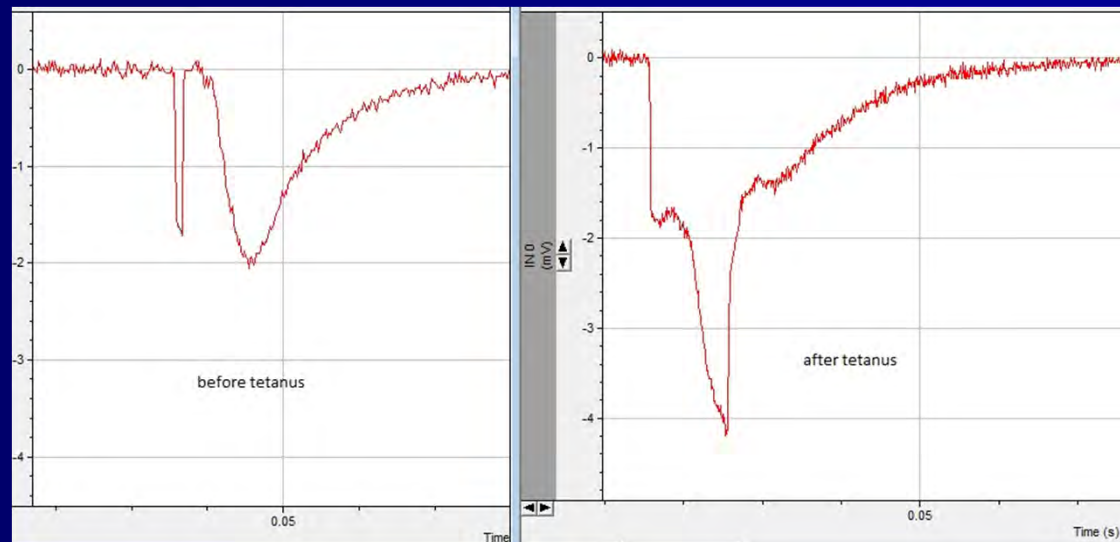


EPSP (intracelulárně – u větších vláken, popř. pomocí techniky terčíkového zámku

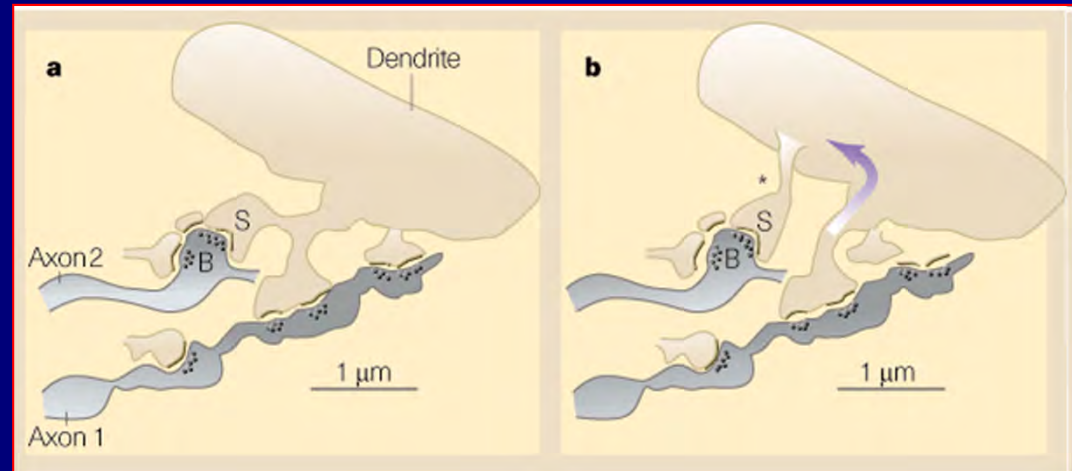
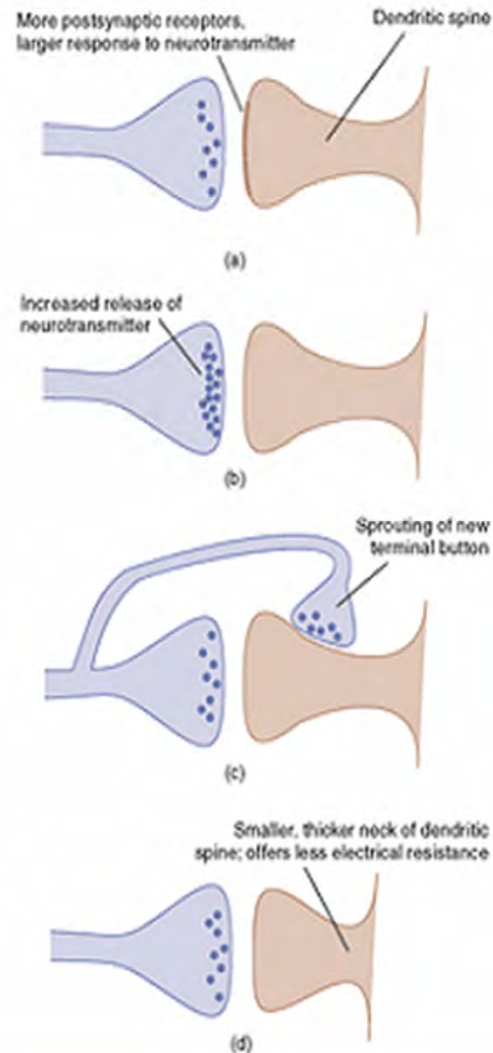
fEPSP (field-EPSP) – extracelulárně, připadá v úvahu u struktur s pravidelným uspořádáním neuronů do vrstev či lamin – např. hipokampus

LTP a LTD

- **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**



V rámci plasticity existuje více možností zesílení synaptické účinnosti



Inzerce nových receptorů do postsynaptické membrány – větší odpověď na stejné množství neuropřenašeče

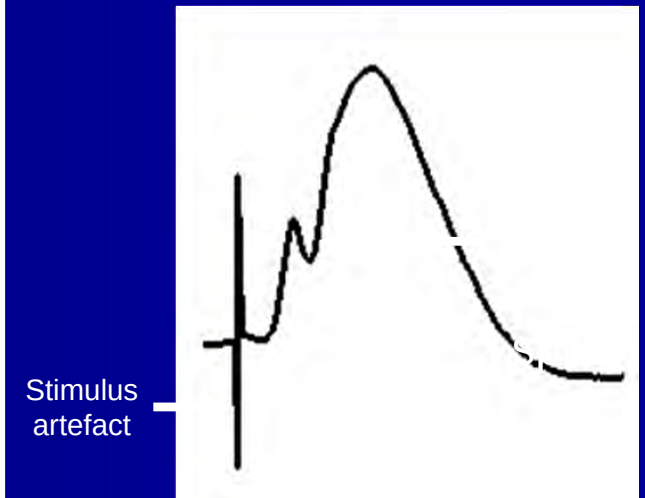
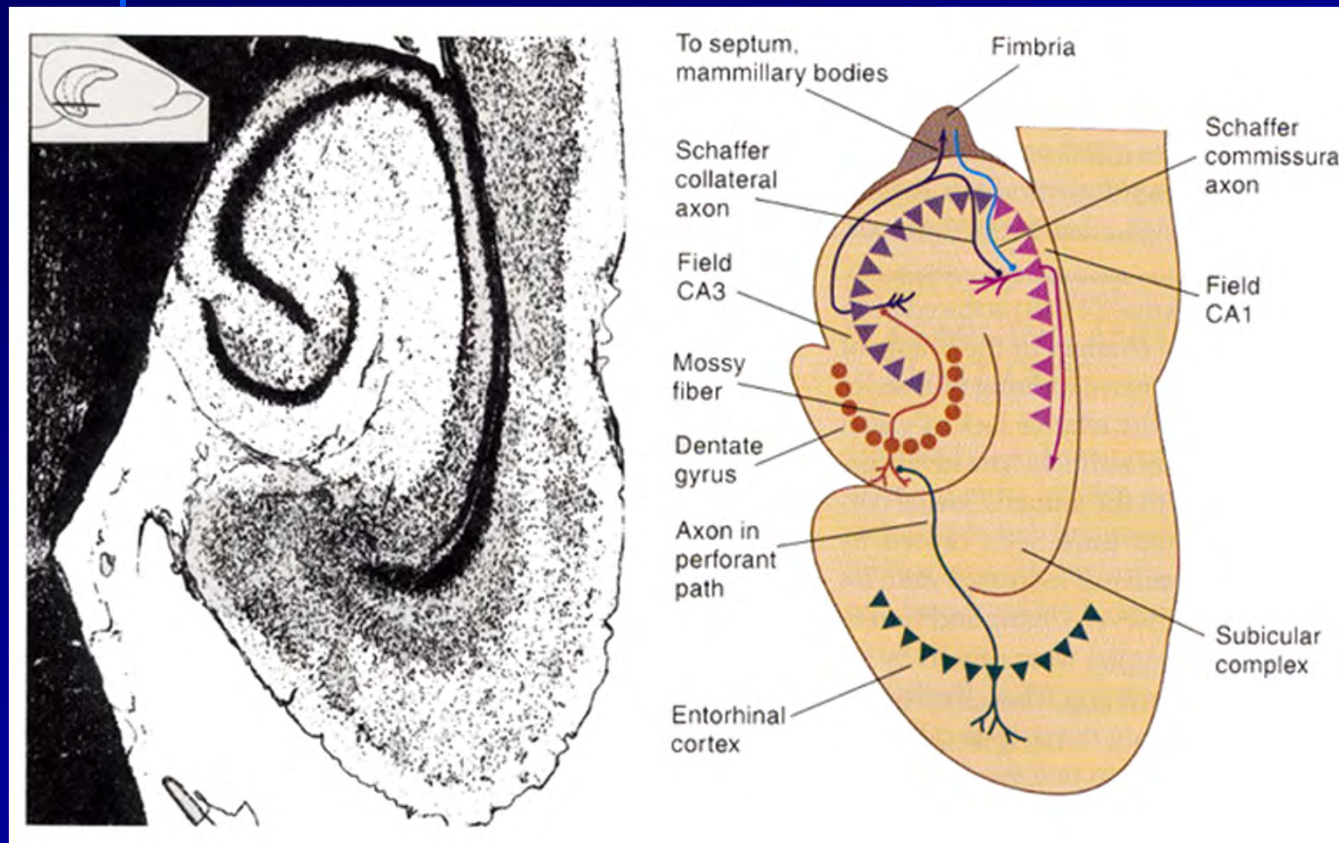
Zvýšení výlevu prostřednictvím retrográdního signálu – nejasné, uvažuje se o NO, popř. extracelulárních adhezních molekulách

Rašení nových synaptických knoflíků

Ztenčení krčku dendritického trnu – změna elektrických vlastností – vyšší excitabilita

Dlouhodobá potenciace - LTP

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



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)

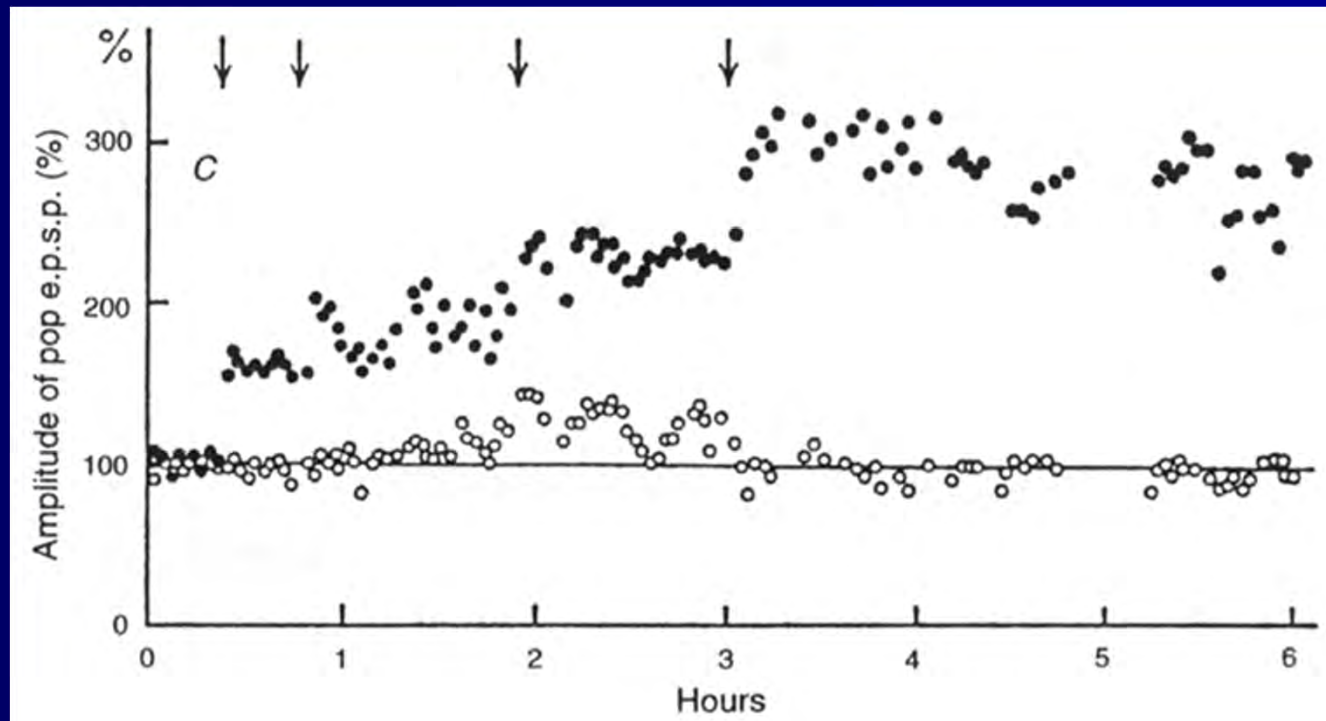


Tim Bliss



Terje Lømo

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.

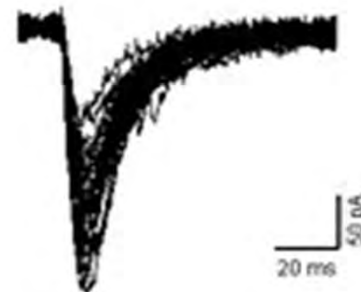
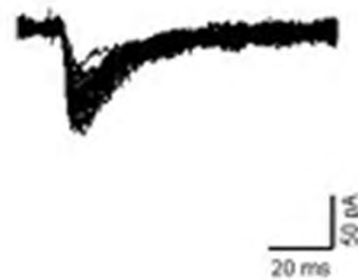
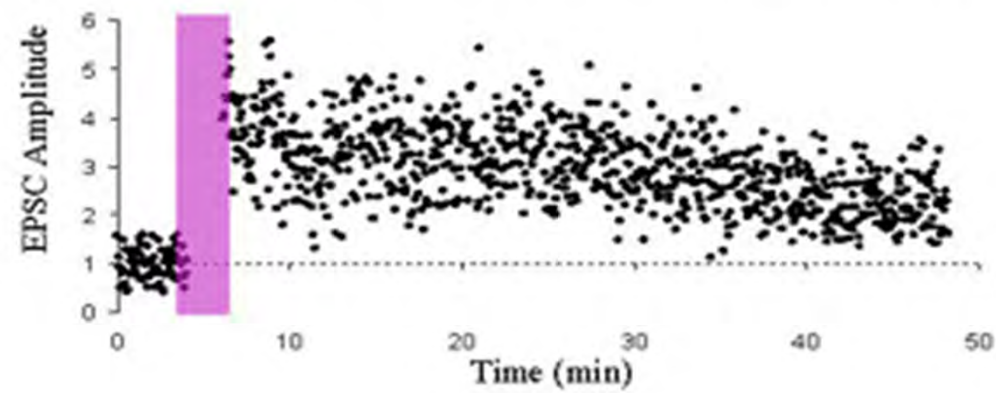


Bliss and Lømo (1973) J. Physiol. 232: 331-356

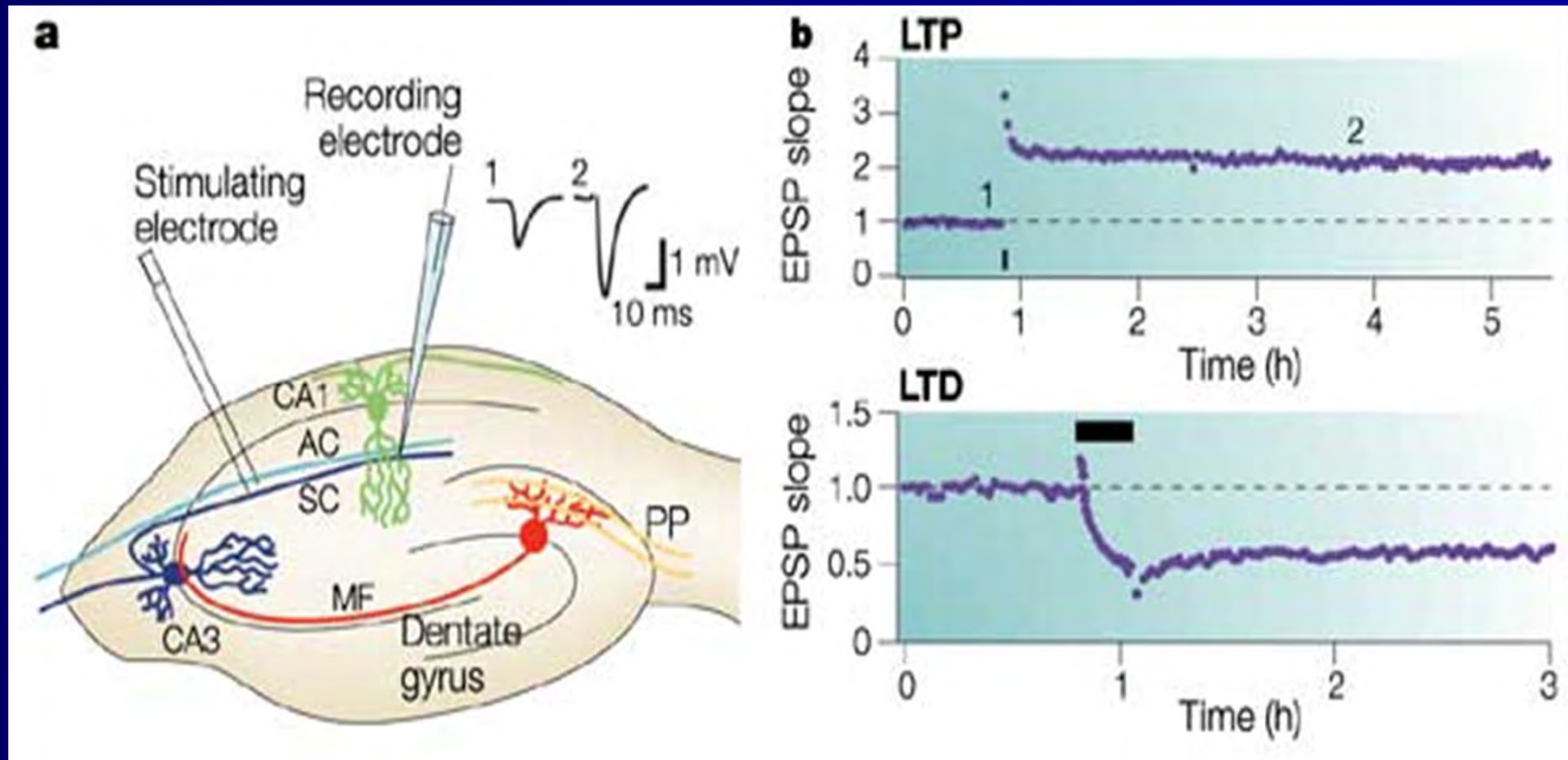
- LTP poprvé popsána v gyrus dentatus králíka

LTP

Long Term Potentiation, a mechanisms for memory formation

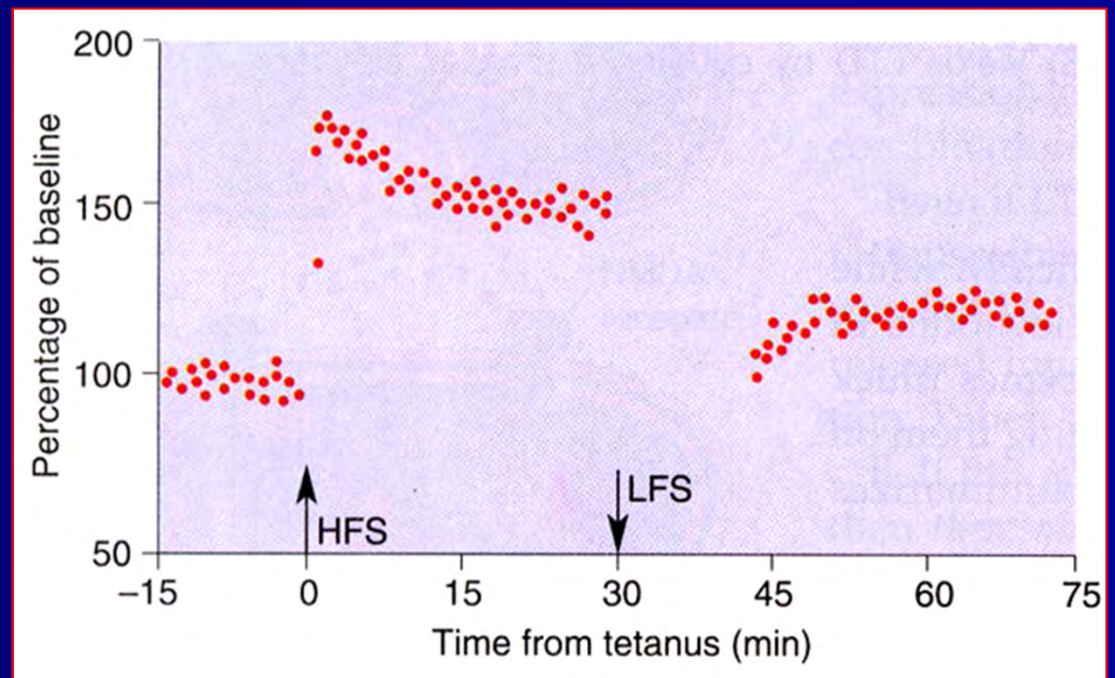
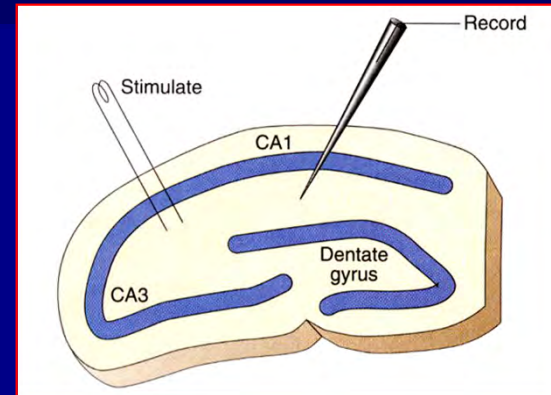


Dlouhodobá potenciace (LTP) vs. dlouhodobá deprese (LTD)

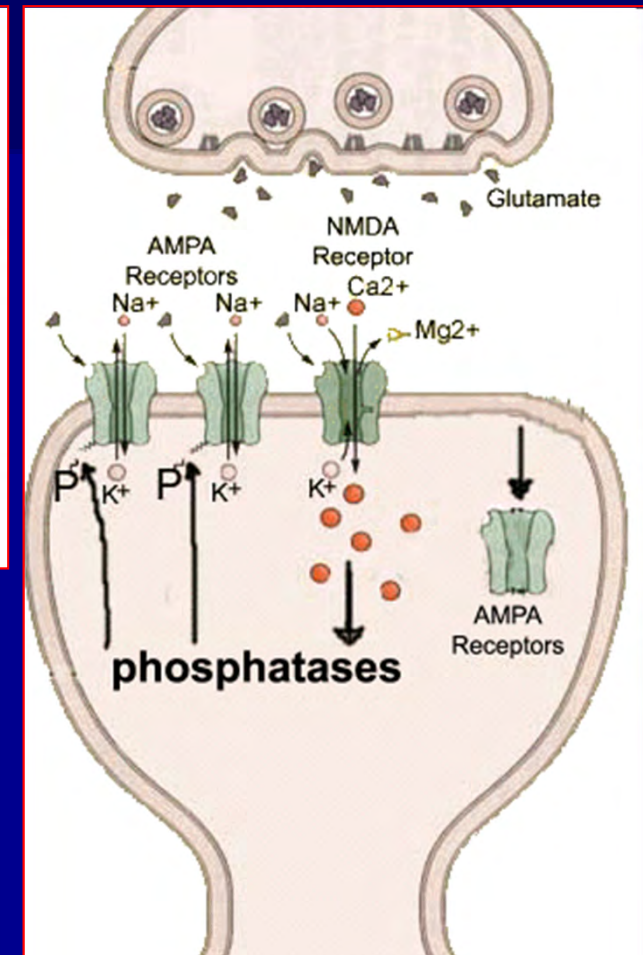
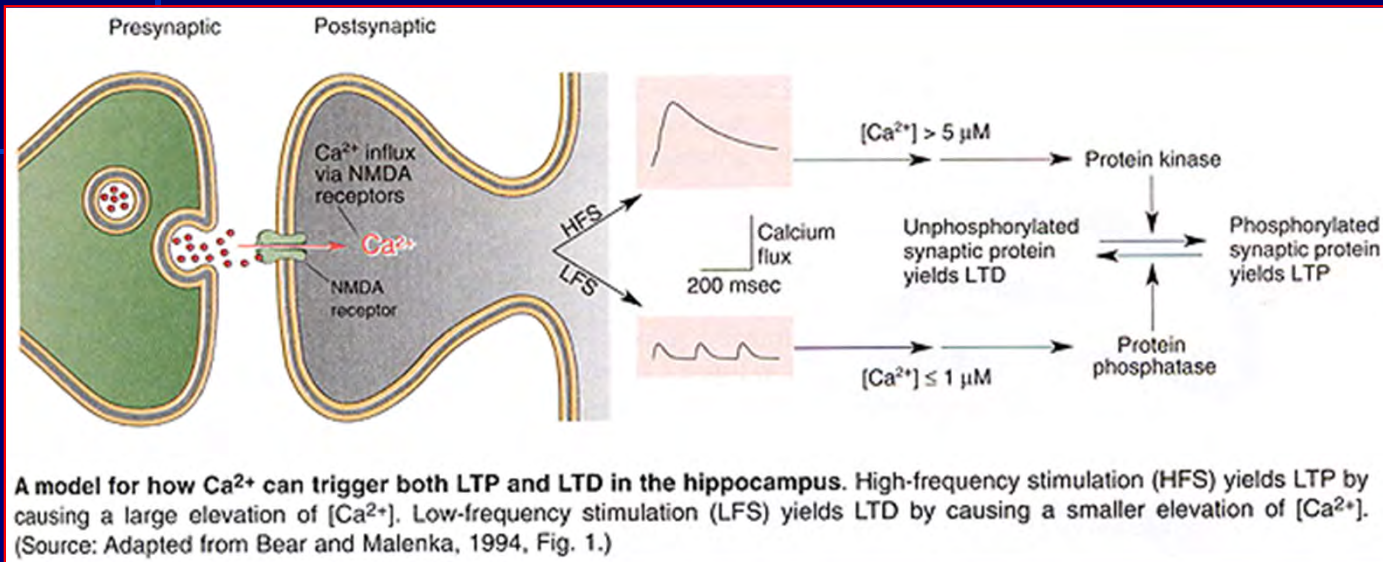


Dlouhodobá deprese - LTD

- Opak dlouhodobé potenciace, jde o **dlouhodobé snížení účinnosti synaptického přenosu následkem repetitivní stimulace** presynaptických vstupů
- Je to vlastně protějšek LTP, z fyziologického hlediska se zdá být intuitivně nezbytný („what goes up, must go down“)
- Vyskytuje se např. v **hipokampu** (nízkofrekvenční stimulace) nebo v **Purkyňových buňkách mozečku** (silná stimulace)



Dlouhodobá deprese - LTD



LTD je podmíněna zpravidla aktivací NMDA receptorů (ne vždy), ale o nižší hodnotě, a zvýšením intracelulárního vápníku, avšak na nižší hladinu, než jaká je pozorována u LTP.

Někdy se LTD mohou účastnit také metabotropní glutamátové receptory (mGluR), popř snad i kanabinoidní receptory (také spřažené s G-proteinem)

Indukce LTD zahrnuje aktivaci fosfatáz (defosforylující enzymy), které následně sníží citlivost glutamátových receptorů a tím redukuje postsynaptickou odpověď na neuropřenašeč.

Může zahrnovat také internalizaci AMPA receptorů z postsynaptické membrány do intracelulárních kompartmentů.

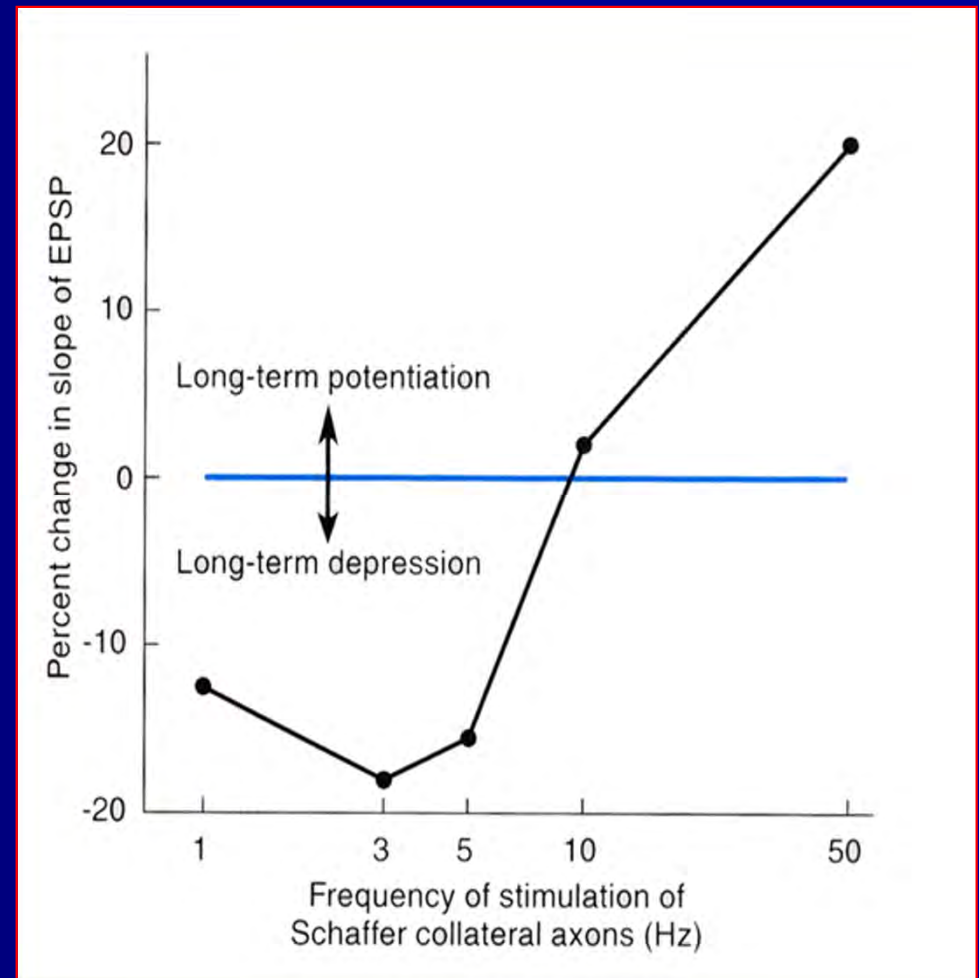
Dlouhodobá deprese - LTD

Na synapsích Schafferových kolaterál (spojení hipokampálních oblastí CA3 a CA1) lze vyvolat LTP i LTD tetanickým drážděním, klíčovým faktorem pro to, který fenomén bude indukován, je frekvence dráždění (viz obrázek).

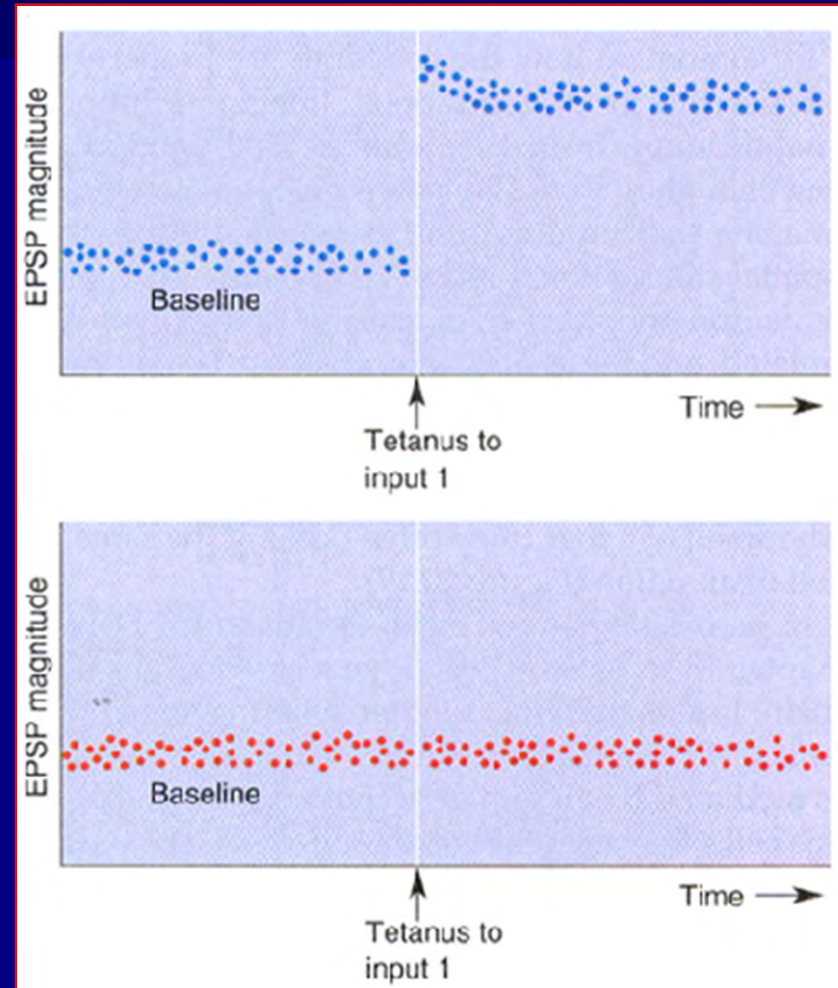
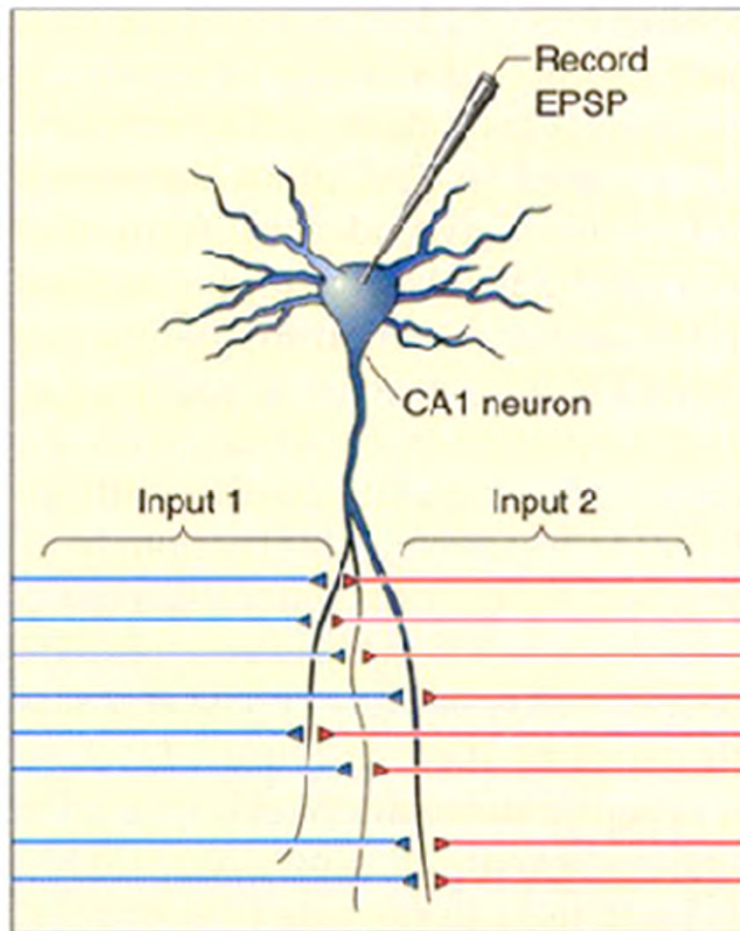
Nízkofrekvenční stimulace vede ke vzniku LTD.

LTD je odlišná od tzv. synaptické depotenciace, což je de facto návrat LTP na klidovou hladinu.

V mozečku se LTD účastní motorického učení.

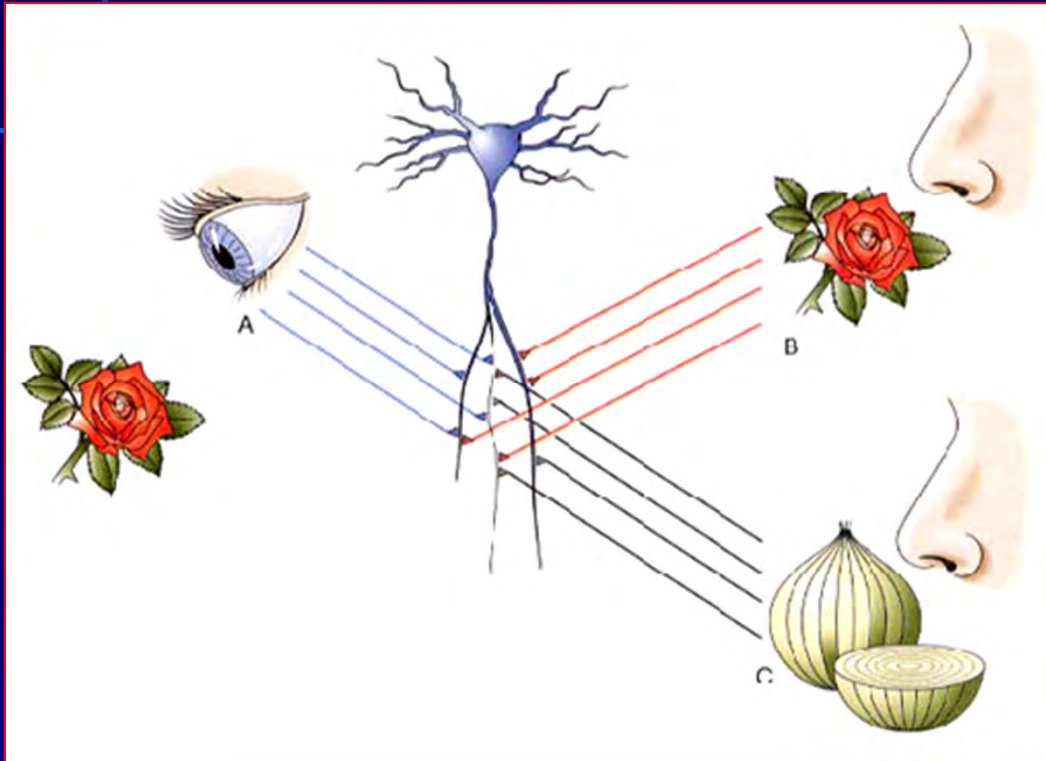


LTP vykazuje specifitu

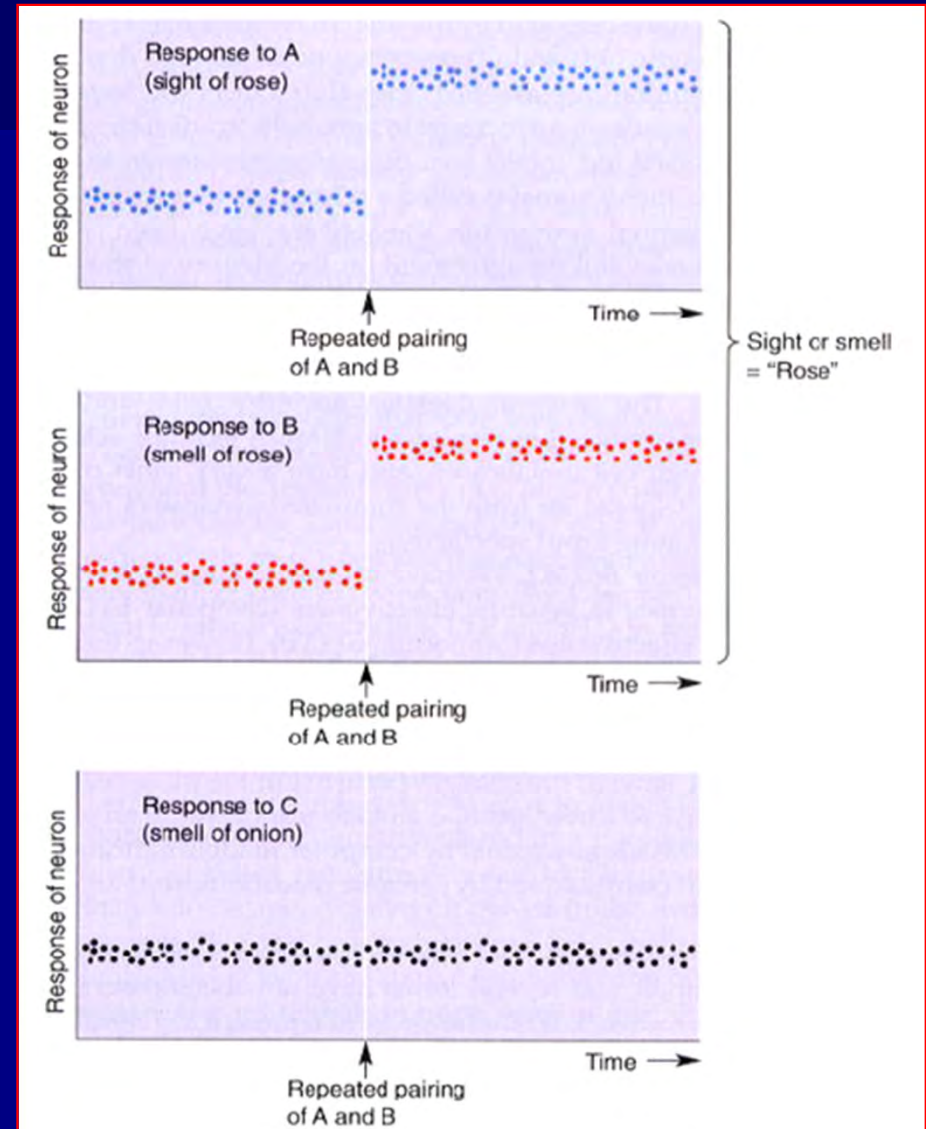


- Během dráždění určitého vstupu **dochází k potenciaci pouze u tohoto stimulovaného vstupu, a ne u sousedních vstupů** (pakliže nejsou tyto vstupy funkčně spřaženy, popř. stimulovány současně – viz asociativita a kooperativita)

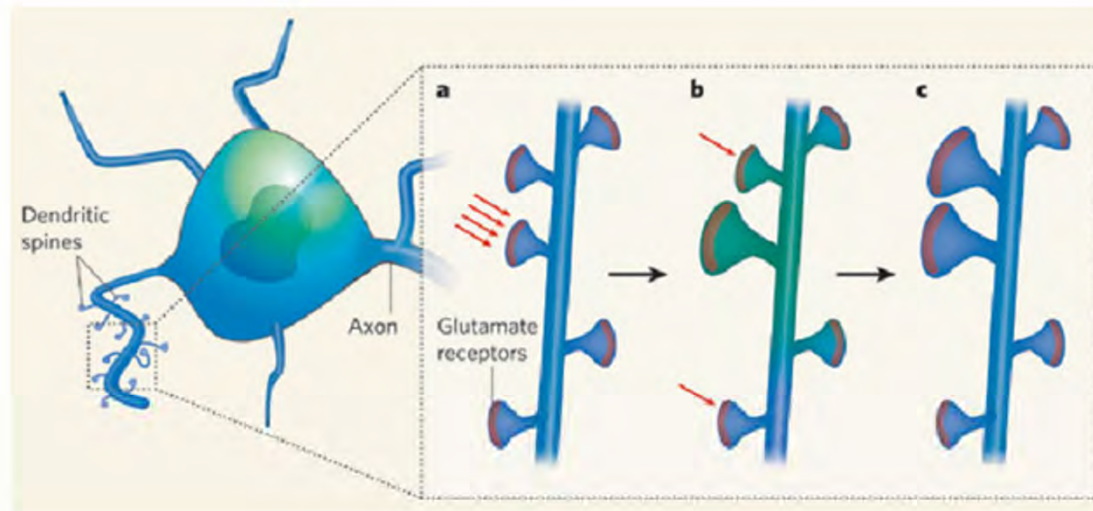
LTP vykazuje asociativitu



- **Asociativita** představuje fenomén, kdy relativně slabá stimulace na jednom vstupu není dostatečná aby vyvolala LTP, současné silná stimulace na jiném, funkčně asociovaném vstupu vyvolá LTP na obou vstupech.
- Často je pozorována např. na synapsích Schafferových kolaterál z hipokampální oblasti **CA3 do CA1**



LTP vykazuje kooperativitu

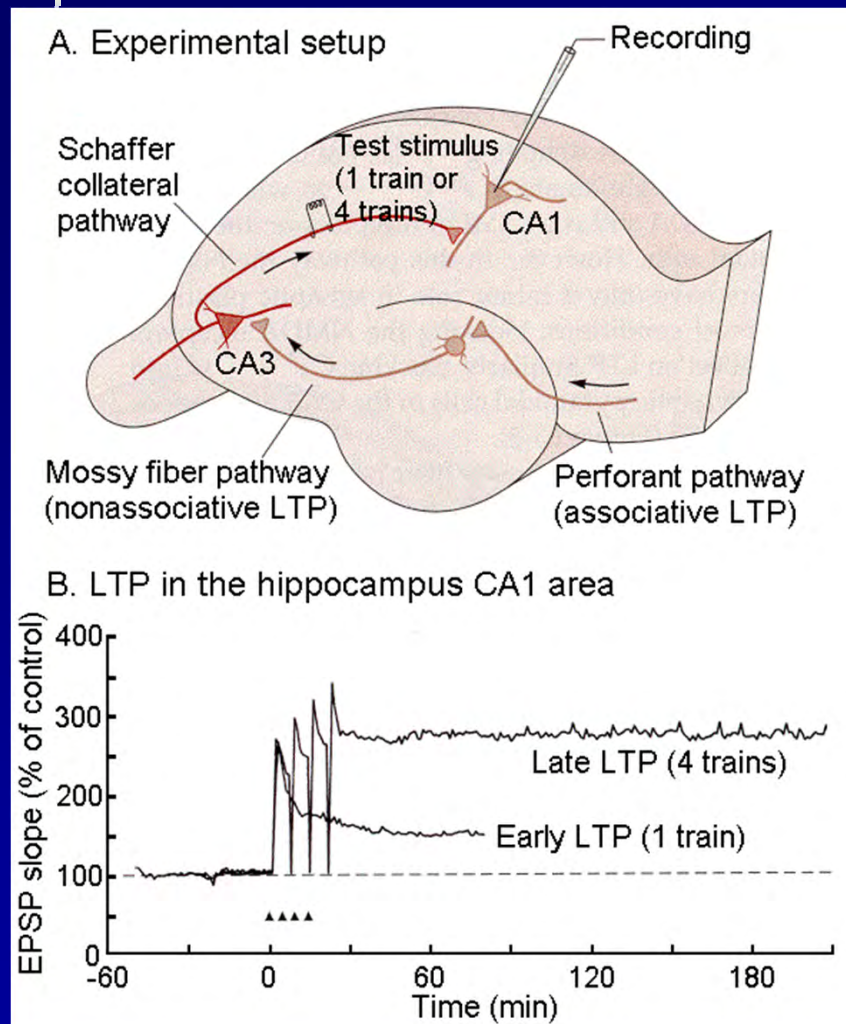


Five dendritic spines, each containing the same number of postsynaptic glutamate receptors, are shown. **a**, When a strong stimulus (red arrows) induces long-term potentiation (LTP) at a single spine, it causes the stimulated spine to grow (**b**). Harvey and Svoboda³ find that LTP induction at one spine also lowers the threshold for LTP induction at its immediate neighbours (within a distance of 10 micrometres). Consequently, weak stimulation of a nearby spine (red arrow) is sufficient to induce LTP and functional and structural plasticity in the neighbouring synapses (**c**). Weak stimulation of the lower spine that lies outside this zone, however, does not induce plasticity. Approximately 10 minutes after the original stimulation, the plasticity threshold returns to normal and spine growth is stabilized.

LTP může být indukována buď **silným tetanickým drážděním jednoho vstupu**, nebo **kooperativně slabším drážděním více vstupů současně**. Pokud je stimulován slabě jen jeden vstup, nedosáhne depolarizace hodnoty potřebné k indukci LTP. Pokud je však takovouto slabší stimulací drážděno **více konvergujících vstupů**, může dojít k sumaci těchto efektů a následné tvorbě dlouhodobé potenciace.

Někteří autoři zastávají názor, že rozdíl mezi kooperativitou a asociativitou je pouze sémantický

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

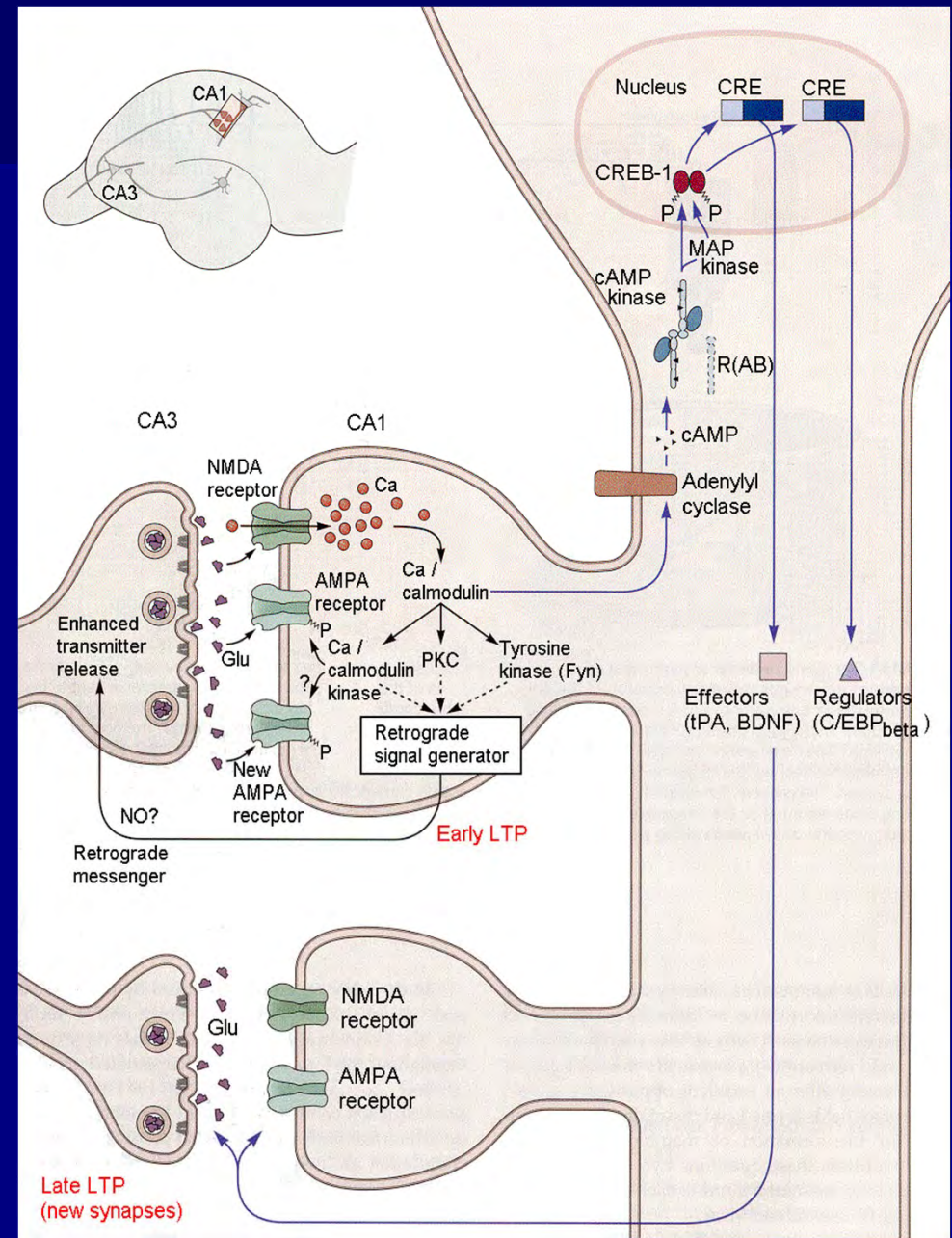


- **Časná fáze** – nezávislá na proteosyntéze
 - **Induction phase**
 - **Maintainance phase**
- **Pozdní fáze** – závisí na syntéze nových bílkovin a remodelaci synapse.
 - **Induction**
 - **Maintainance**

Časná a pozdní fáze LTP - mechanismy

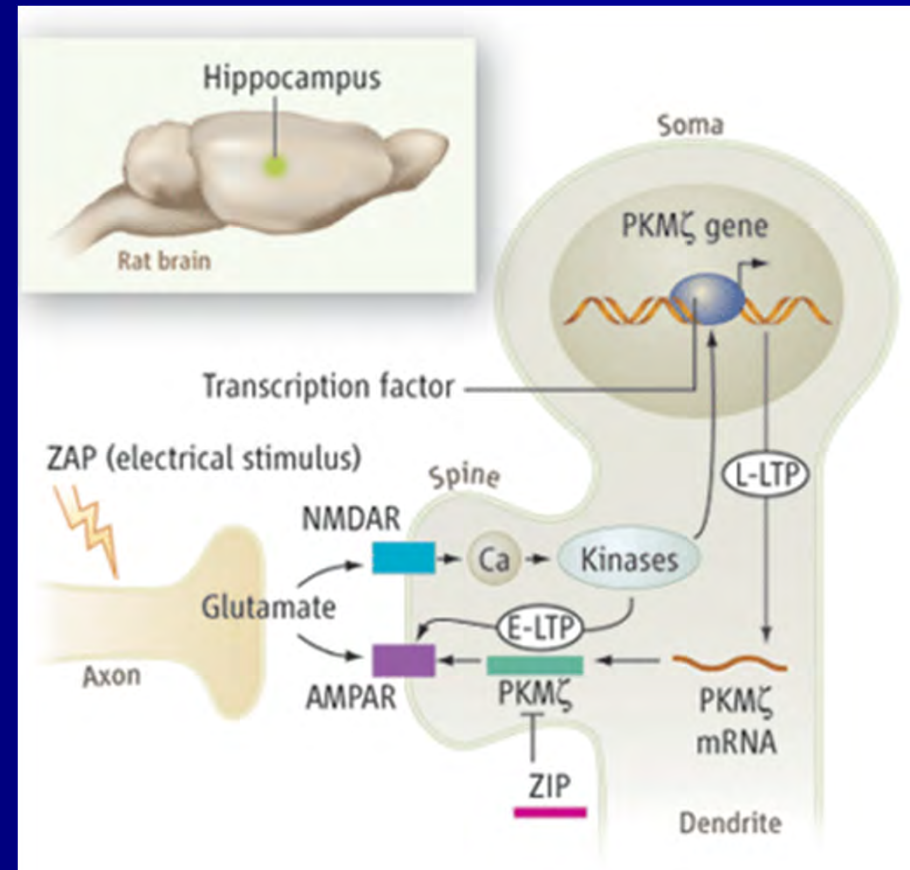
- **Iniciace časné fáze – zvýšená aktivace AMPA receptorů – depolarizace – odblokování NMDA receptorů – vtok Ca^{2+} – Ca-calmodulin kináza II – PKC – MAPkináza (MAPK)**
- **Udržování časné – CMKII a PKC ztrácí závislost na Ca – perzistentní aktivita > fosforylace AMPA receptorů, inserce rezervních AMPA 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

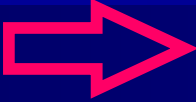
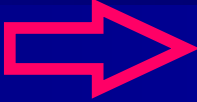
- Během udržovací fáze dochází přes kinázy a transkripční faktory k syntéze PKM ζ (zeta), což je podtyp PKC, která je po své syntéze konstitutivně aktivní a reguluje *trafficking* a syntézu AMPA receptorů, reorganizaci synaptických proteinů a remodelaci synapse.
- Patrně i jiné kinázy, ale nedávná studie 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 rolí mnoho regulačních kináz, ale na PKM ζ se patrně signál sbíhá

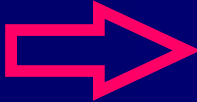
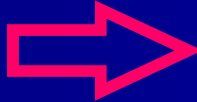


Retrográdní signalizace

- 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)

Teoretická koncepce studia vztahu “LTP-paměť”

Zkušenost  Změna synaptické účinnosti
(přirozená plasticita)  Paměť

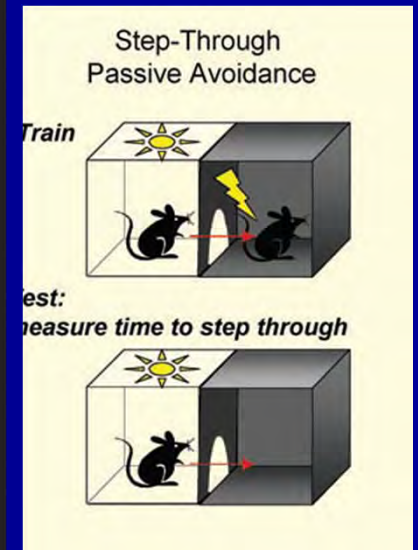
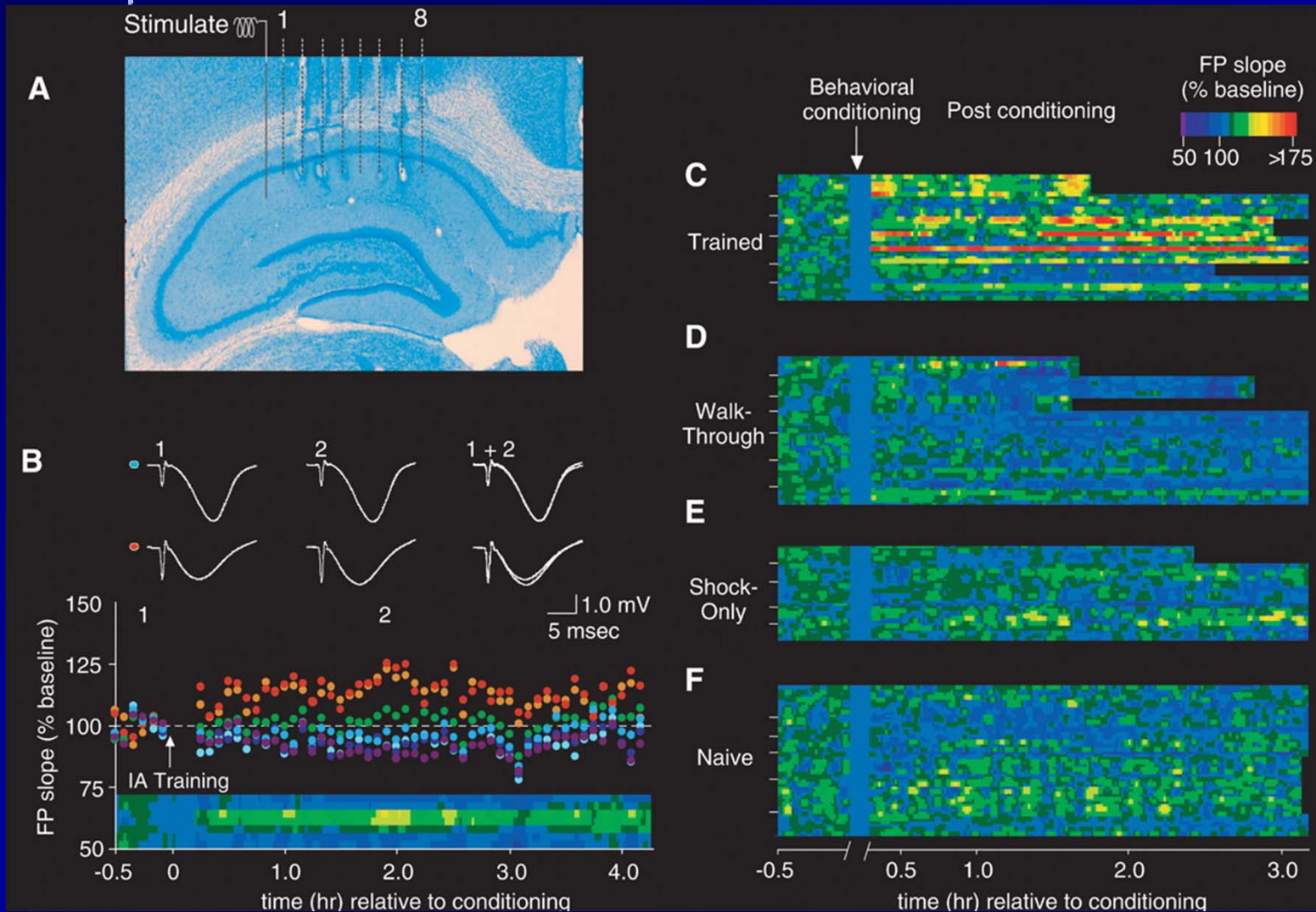
Tetanizace  Změna účinnosti
synaptického přenosu
(LTP)  Zvýšení evokované
odpovědi (EPSP)

Typy studií zabývajících se vztahem LTP - paměť:

- Vliv učení na synaptickou sílu a LTP
- Vliv tetanizace (saturace LTP) na učení
- Vliv manipulace (např. blokády) synaptické plasticity na učení paměť

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

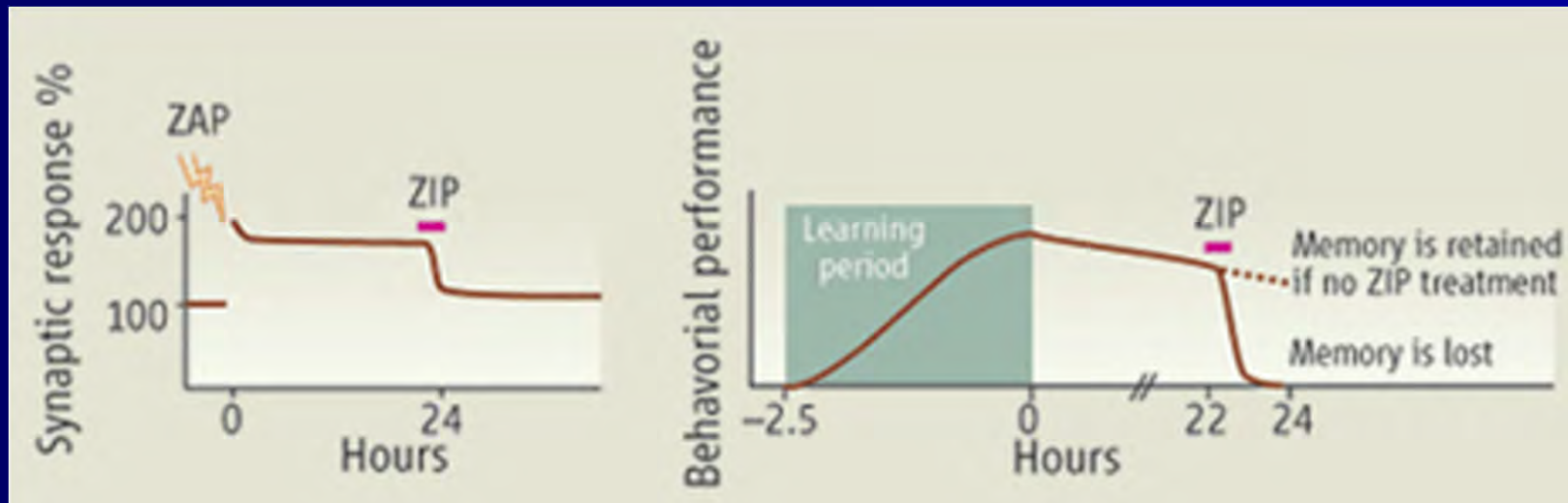


Učení přímo indukuje LTP II

- 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

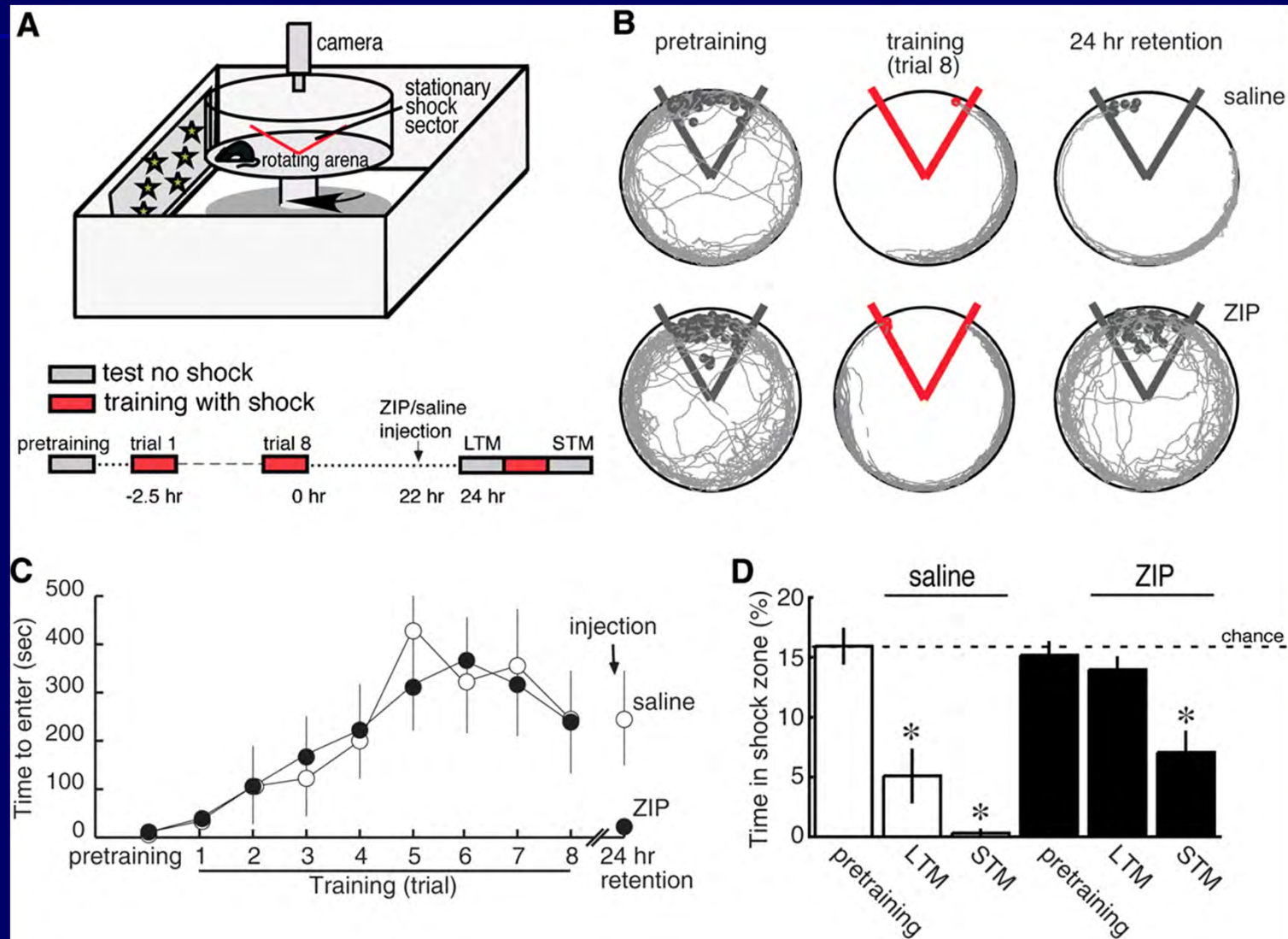
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. **Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP.** Science. 2006;313(5790):1141-4



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 ζ , maže paměťovou stopu, ale nebrání novému učení.



Problematické otázky

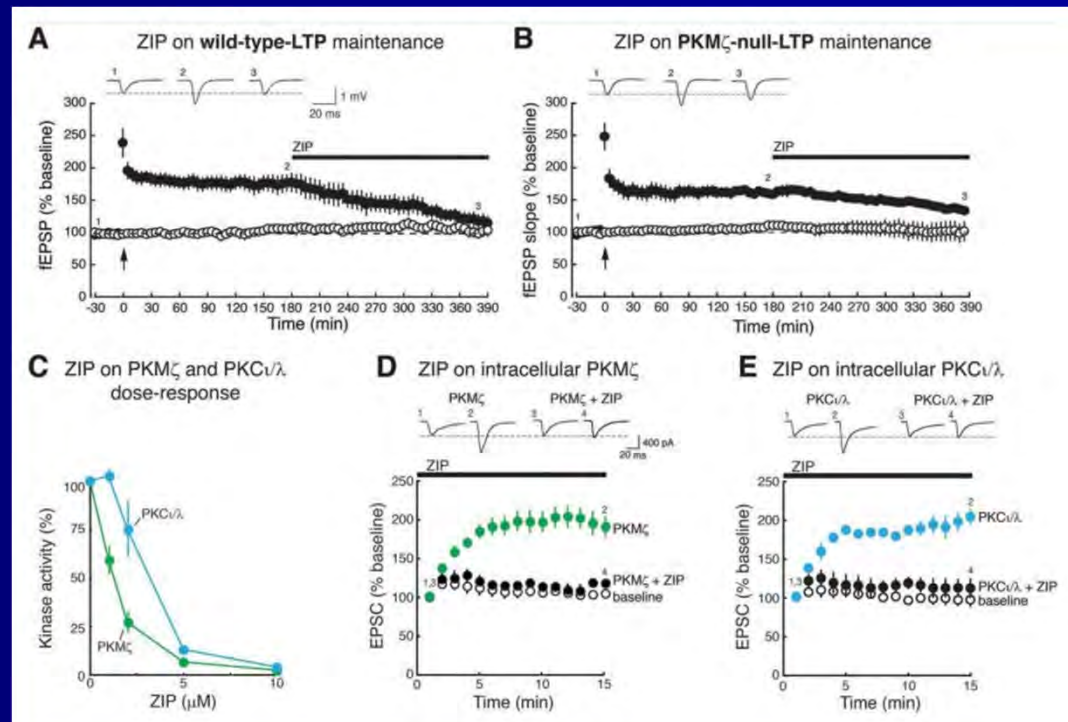
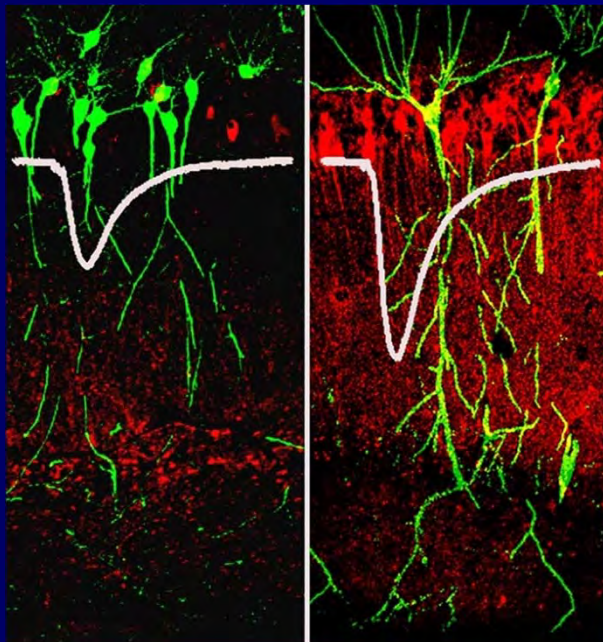
- Je LTP indukována také jinými typy učení než pasivním vyhýbáním?
- Maže inhibice PKM ζ pomocí peptidu ZIP také jiné druhy paměti než place avoidance, což je kognitivní úloha vysoce závislá na hipokampu?
- Je toto vymazání paměti patrné i v jiných strukturách v mozku než je hipokampus?
 - Některé určitě, 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
 - Bylo 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.

Negativní důkaz o PKMzeta a LTP

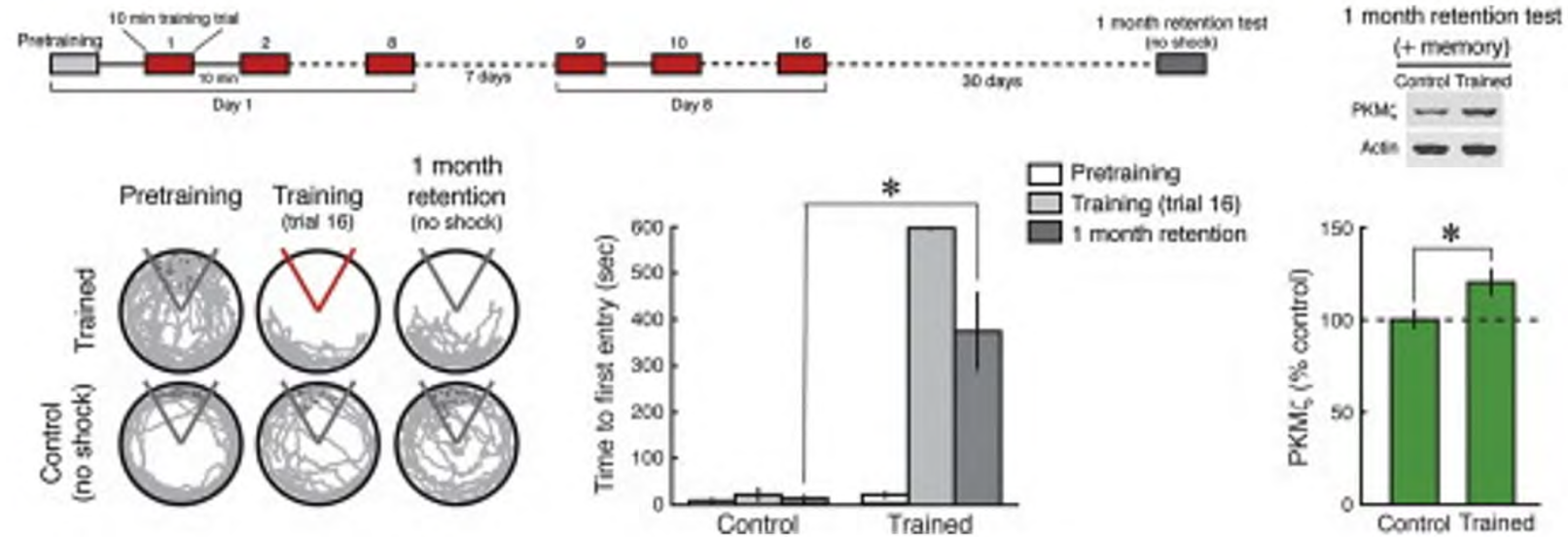
- Letos vyšla práce popisující transgenní potkany s konstitutivní a podmíněnou delecí PKM ζ a u nich nebylo pozorování žádné zhoršení paměti ani LTP.
- Naopak aplikace ZIP těmto potkanům vedla k vymazání LTP, zdá se že ZIP tedy blokuje doposud neznámé procesy, kromě aktivity na PKM ζ

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

Klíčová kompenzace pomocí PKC δ / λ



„The story continues“



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

