

# Pokročilé techniky ve studiu učení a paměti

Pokroky v neurovědách

Aleš Stuchlík a Štěpán Kubík

# Pokročilé metody studia učení a paměti

## ■ Elektrofyzilogie

- Extracellular multiple single unit recording
- Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat

## ■ Intervenční techniky

## ■ IEG Imaging

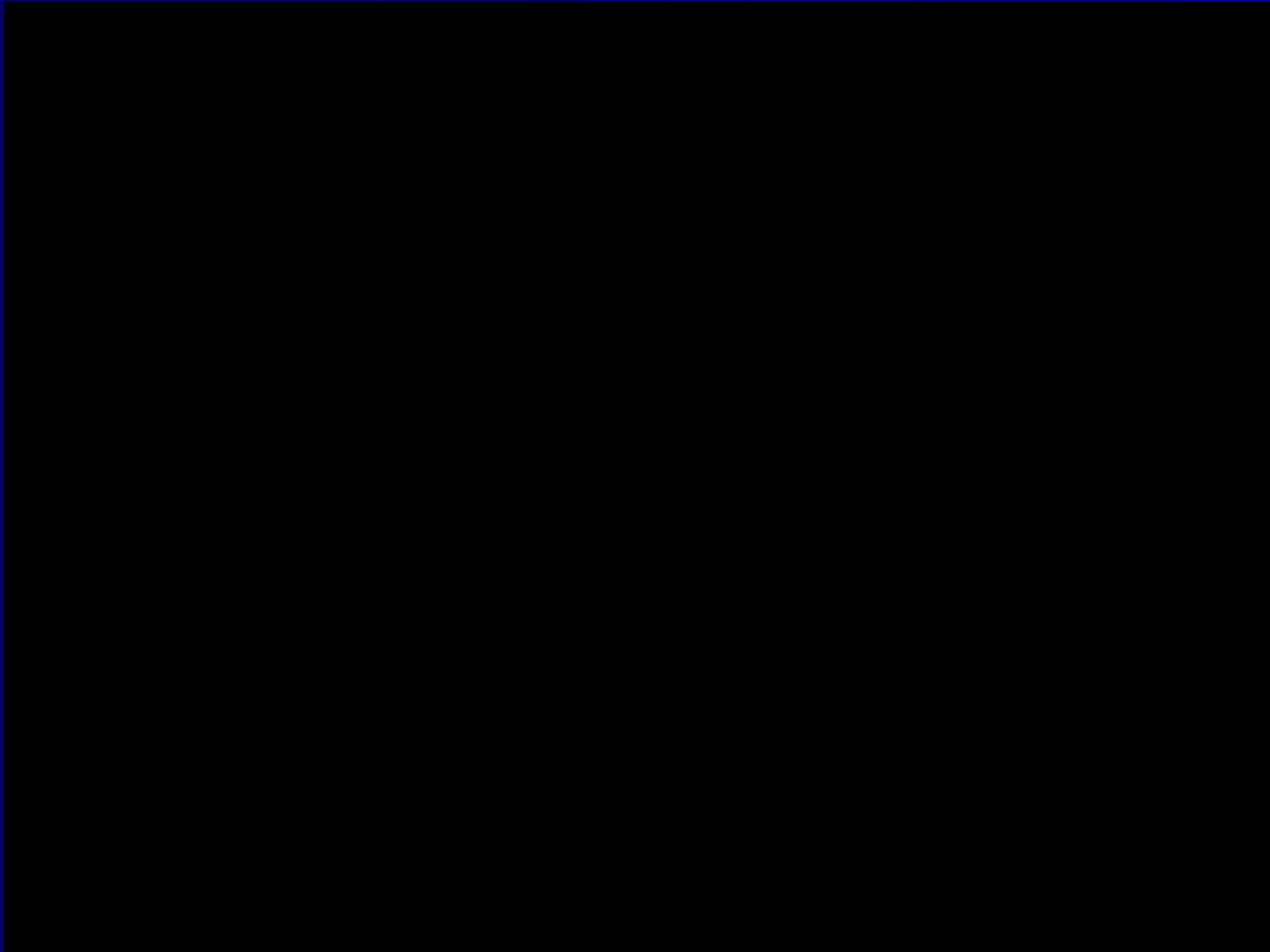
## ■ Optogenetika, chemogenetika

## ■ Clarity - zprůhledňování

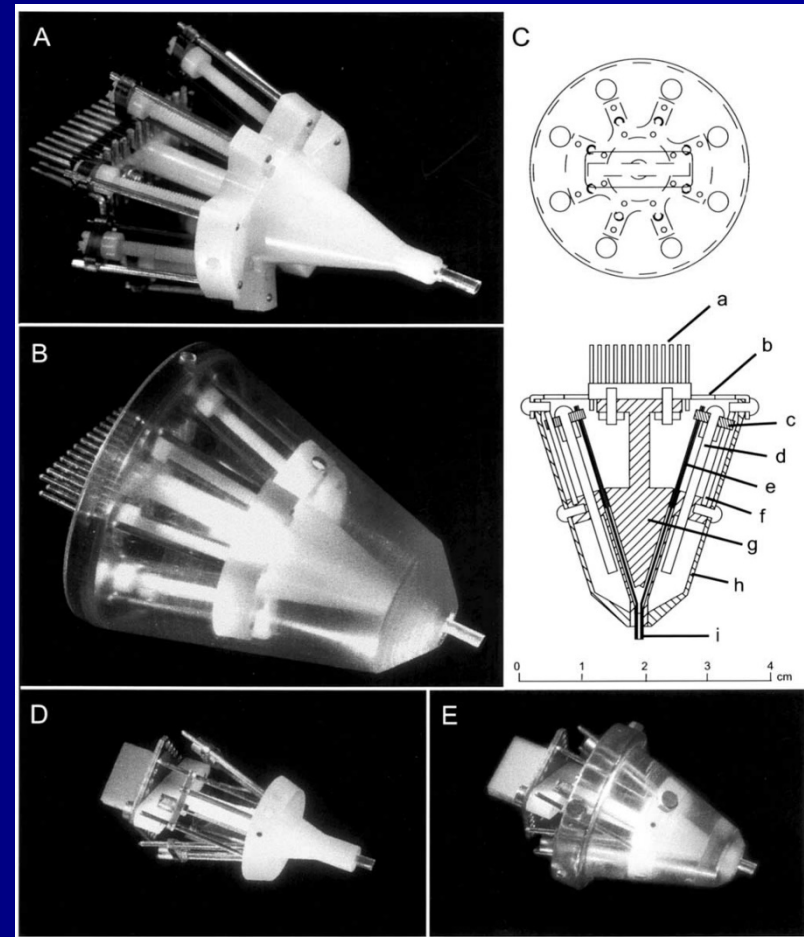
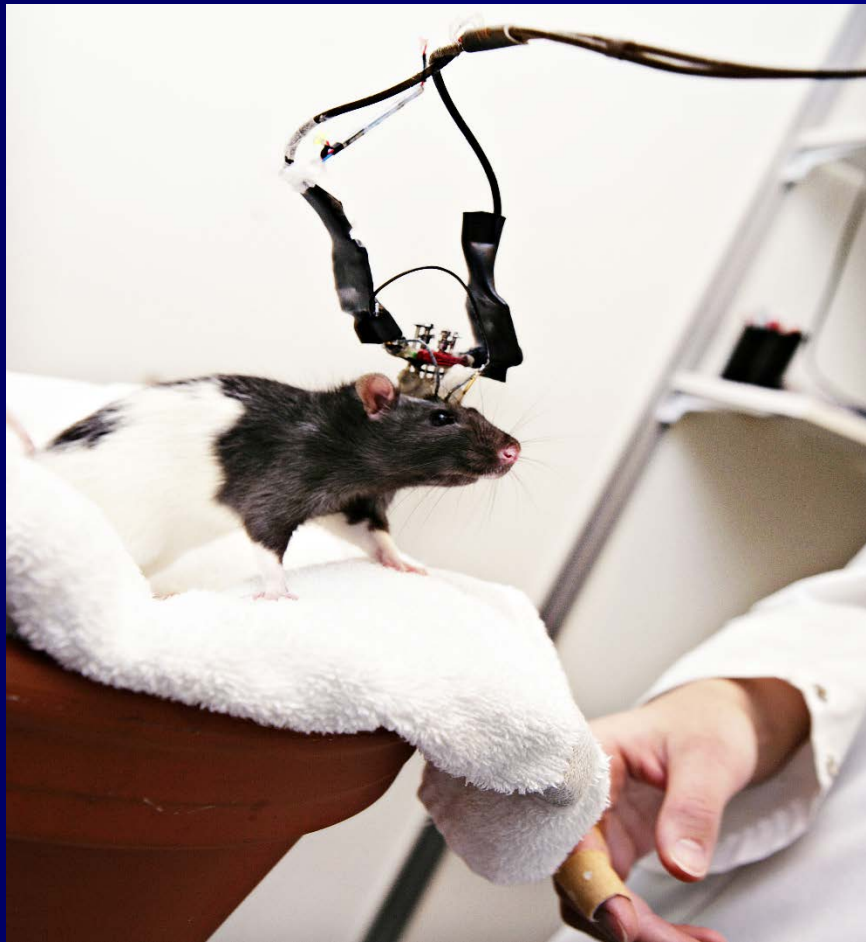
# Eletrofyzologie

- Multiple single unit recording
  - Hippocampal place cells
  - Tetrody
  - Klastrování
    - roztřídění 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

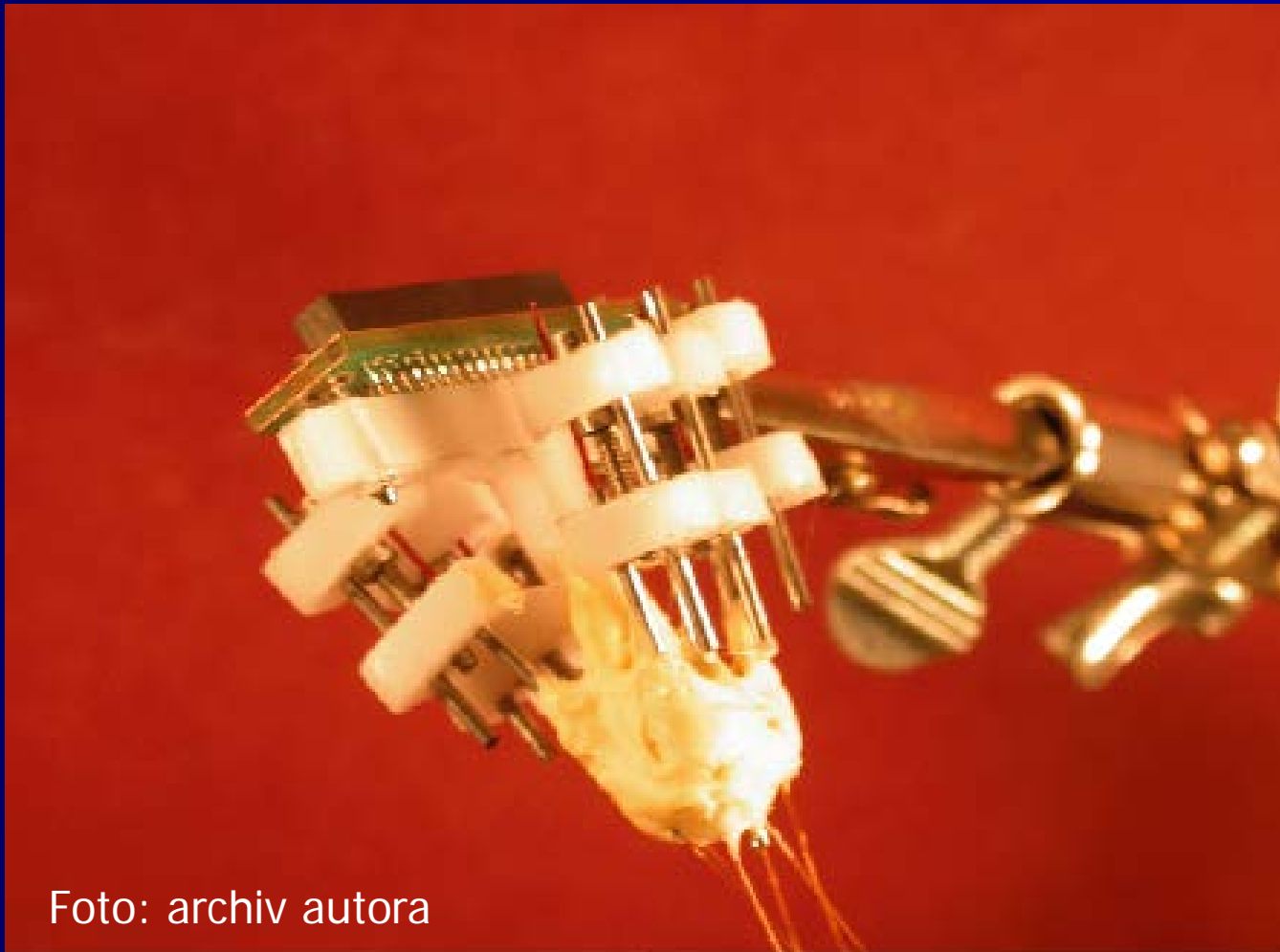


Foto: archiv autora

# Tetrodes & microdrives

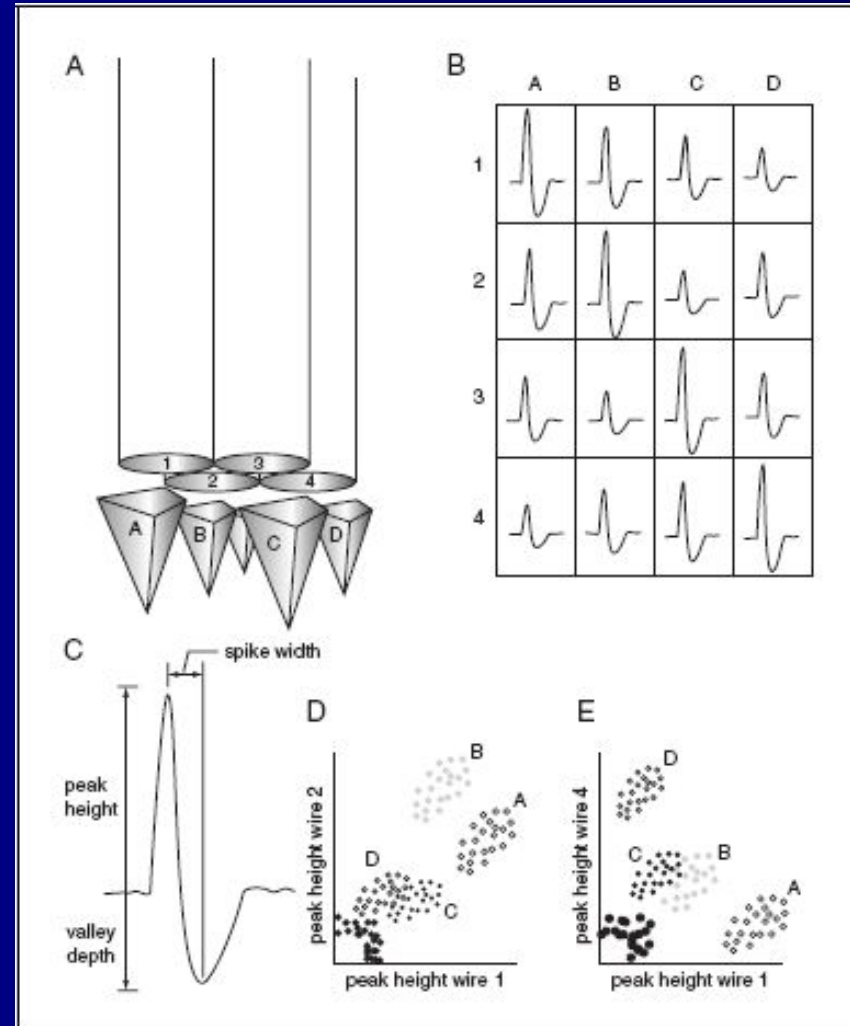


Foto: archiv autora

# Multiunit recording

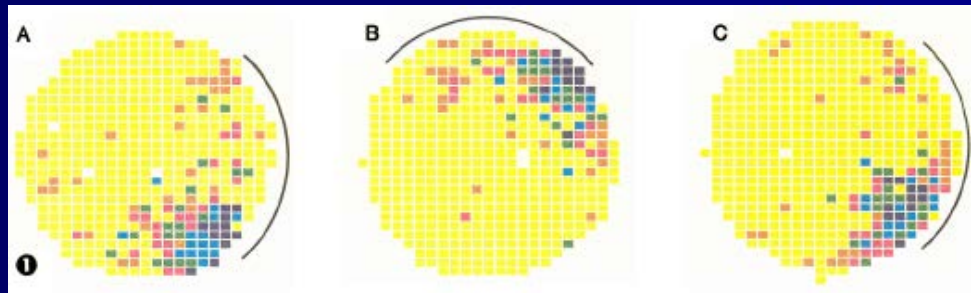
- Všechny 4 elektrody (12.5 - 25 $\mu$ m) jedné tetrody vidí stejné neurony, ale každá trochu jinak.
- Spiky z jednotlivých neuronů vytváří shluky (clustery).

Szymusiak & Nitz, Curr Prot Neurosci  
6.16, 2002

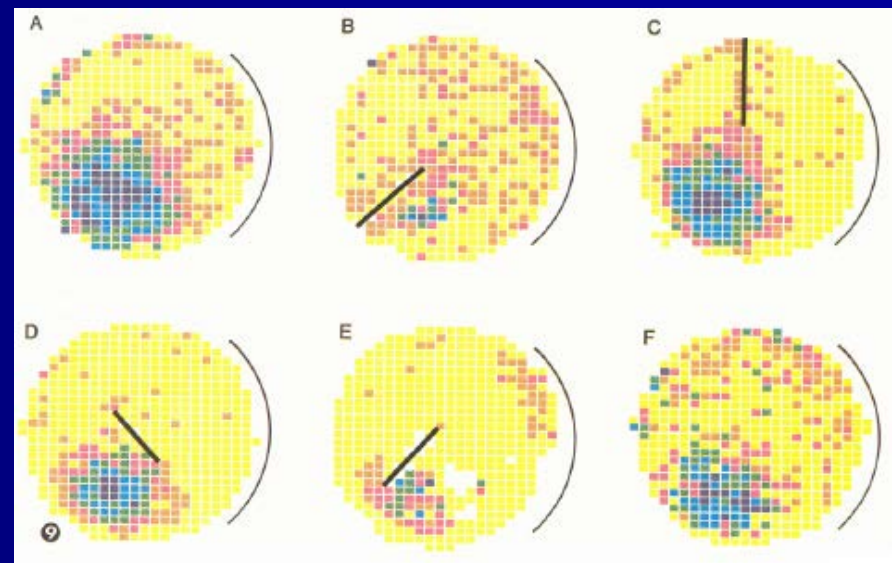
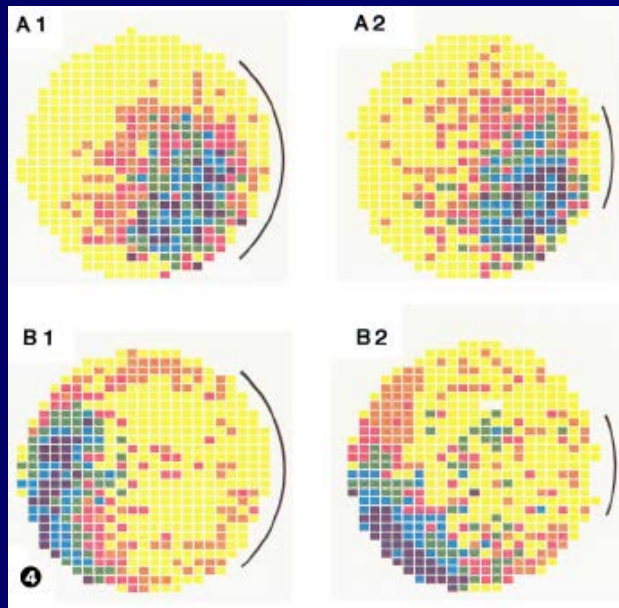
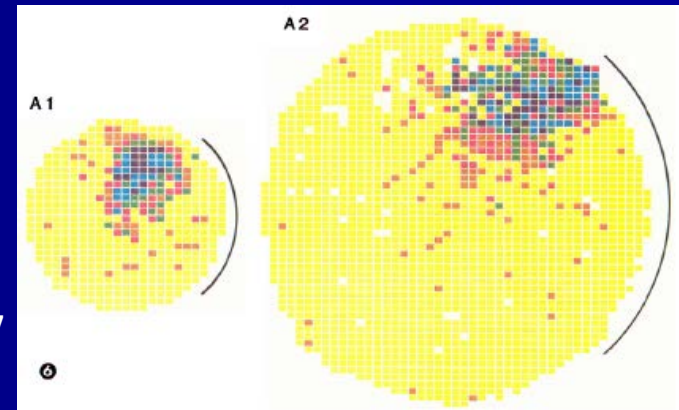




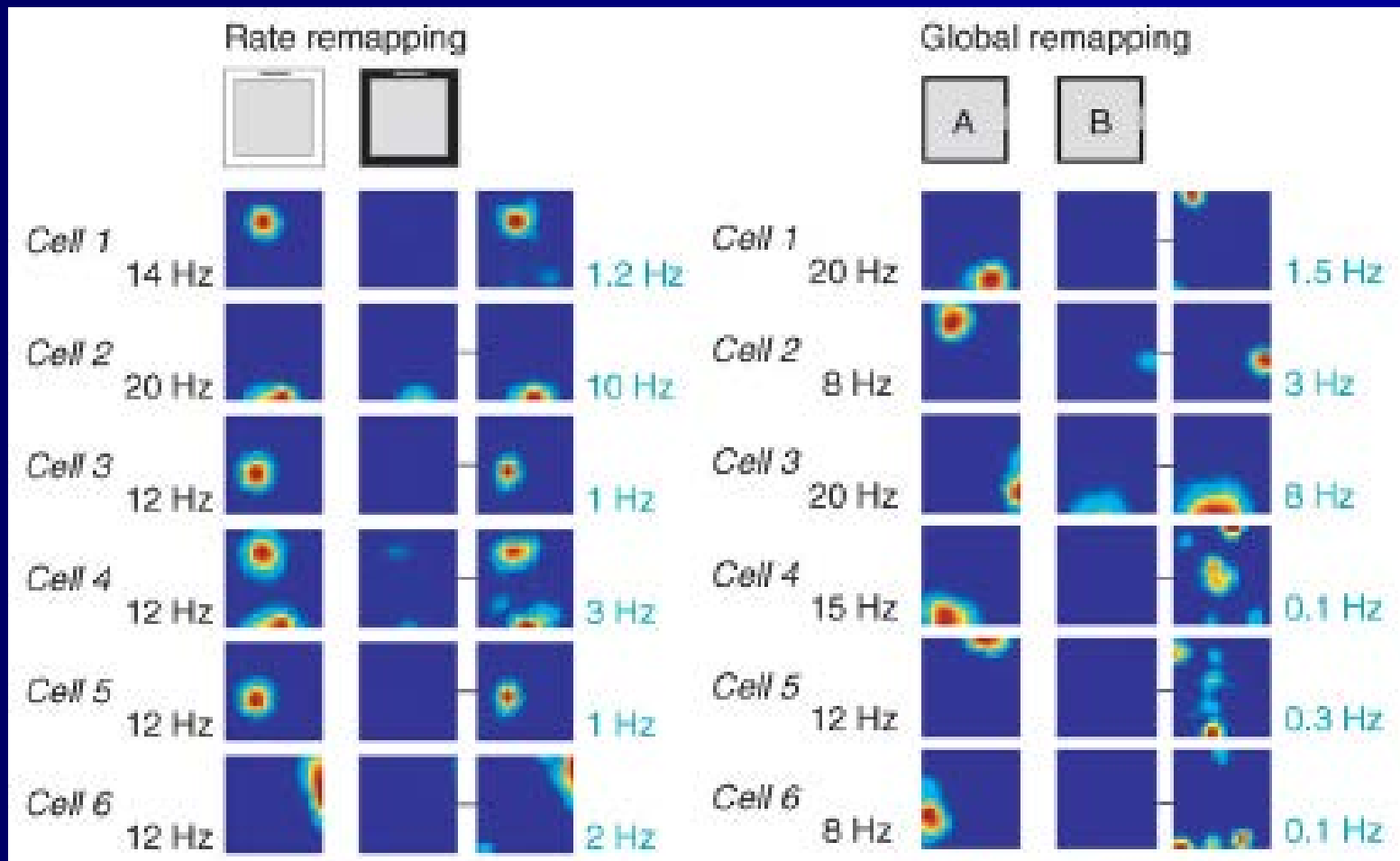
# Firing rate maps a změny v prostředí



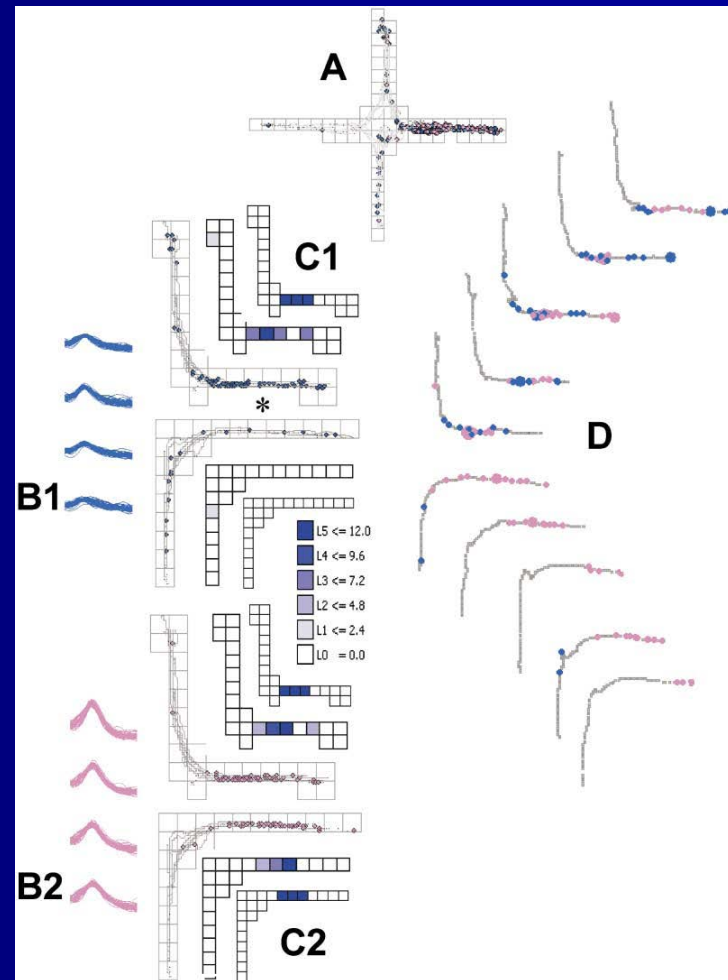
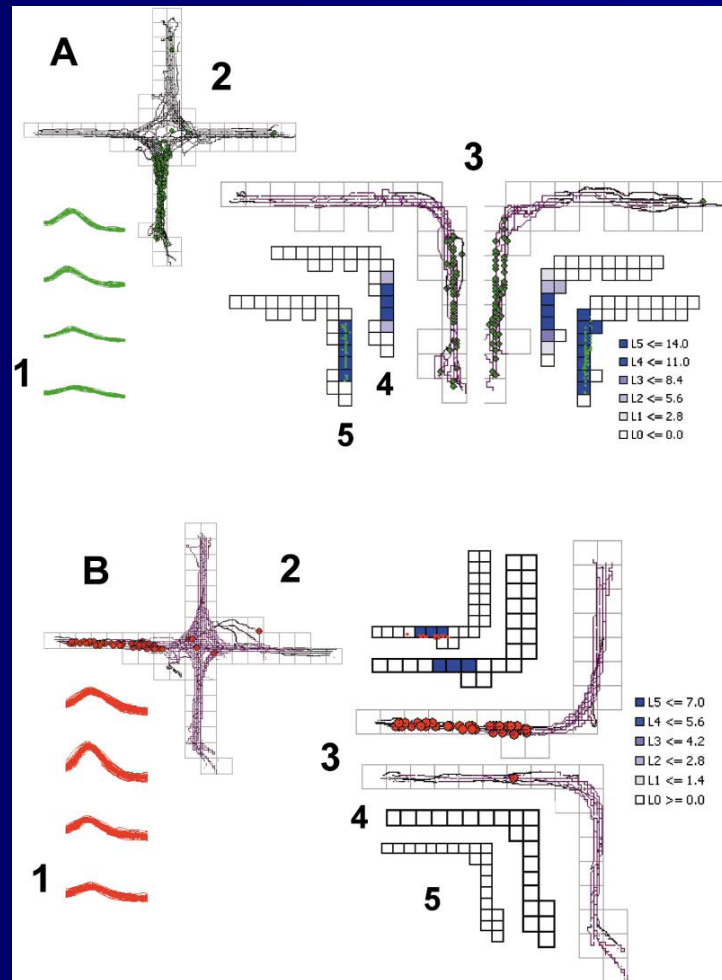
Muller & Kubie, 1987



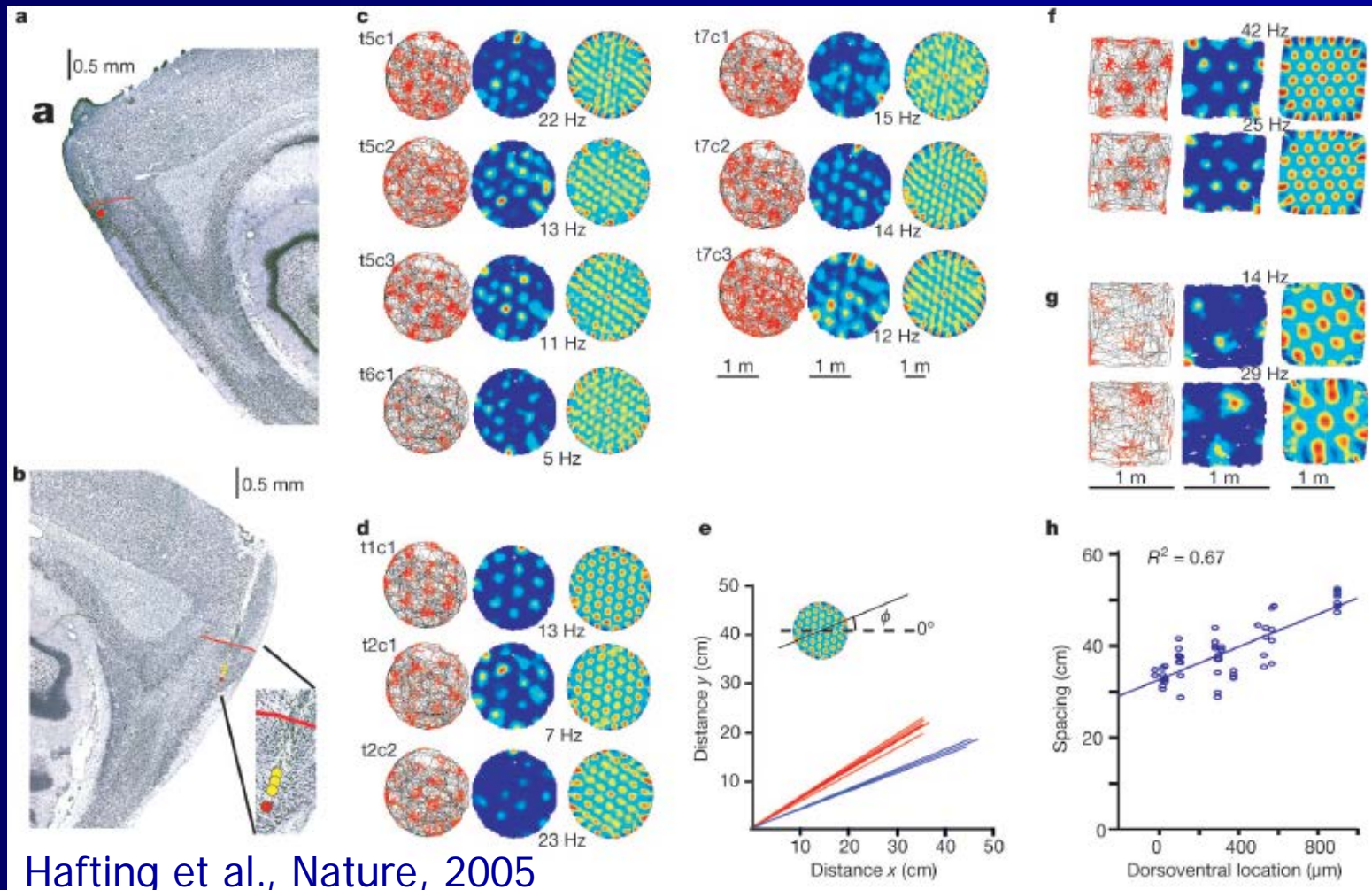
# Remapping



# Prospective and retrospective coding



# Entorhinal grid cells



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 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
  - Selective
    - Cre recombinase a loxP system
    - cell type-specific promoters
  - 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

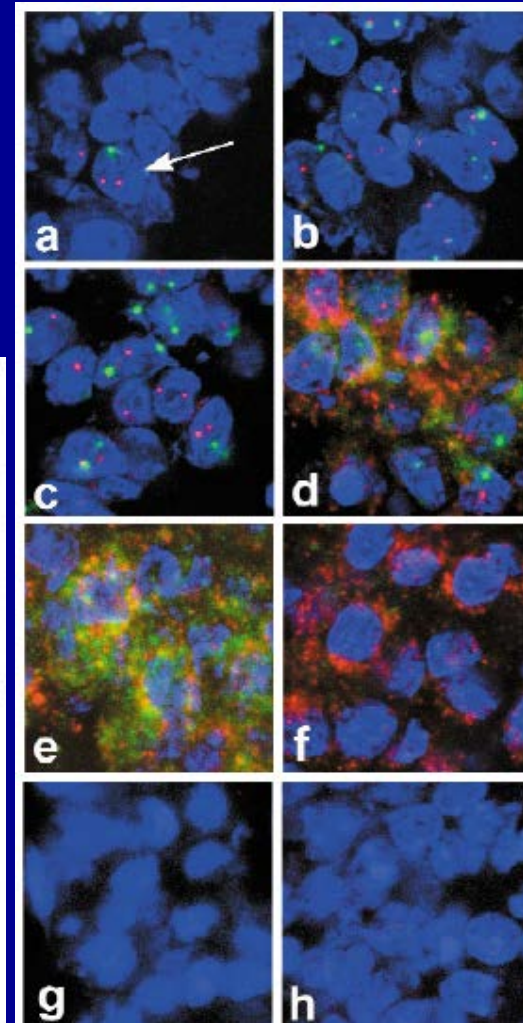
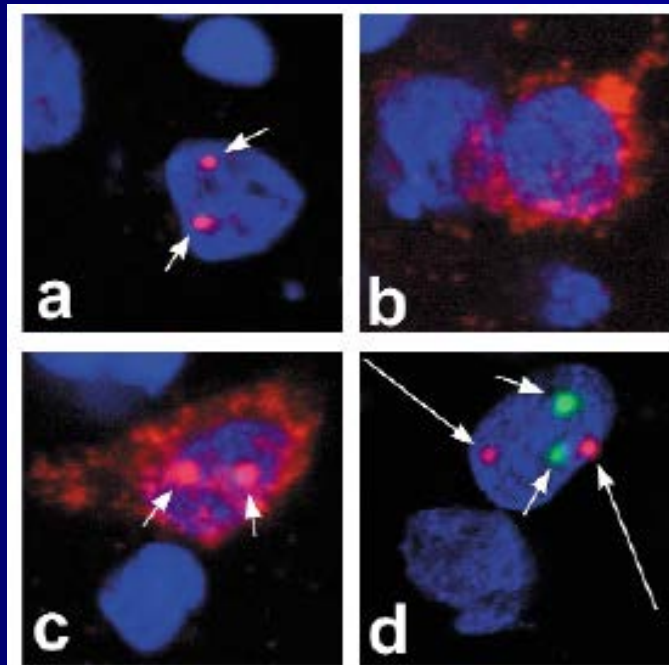
- Nervová aktivita spouští expresi genů časné odpovědi (immediate-early genes – IEGs) v neuronech
  - C-fos, Zif268/Egr 1/..., Narp, BDNF, Arc, Homer1a
- RNA
  - in situ hybridization
    - Radioaktivní
    - Fluorescenční - FISH
  - qPCR
  - Northern blot
- Protein
  - Immunohistochemistry
  - Western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

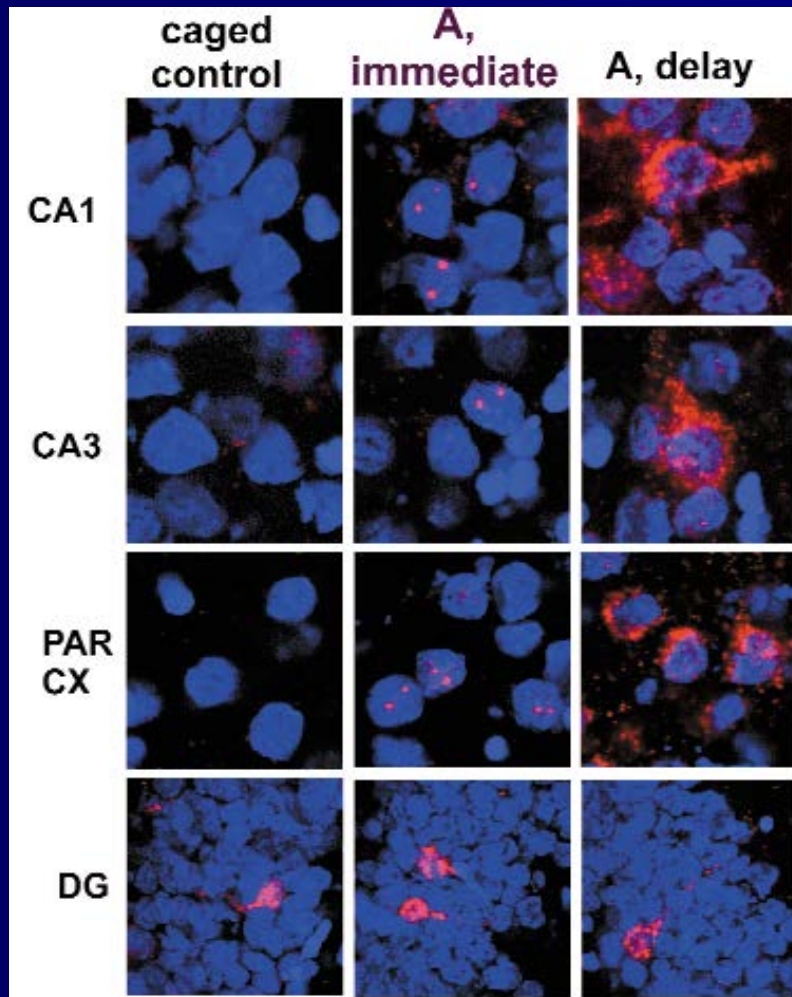
Různé druhy IEG signálu: *Arc*  
Intranuclear foci -INF (a); *Arc* - cytoplasmic (b); double-positive *Arc* signal (c); double label *Arc* (zeleně) a *zif268* (červeně) (d)

Guzowski et al., 1999



# catFISH

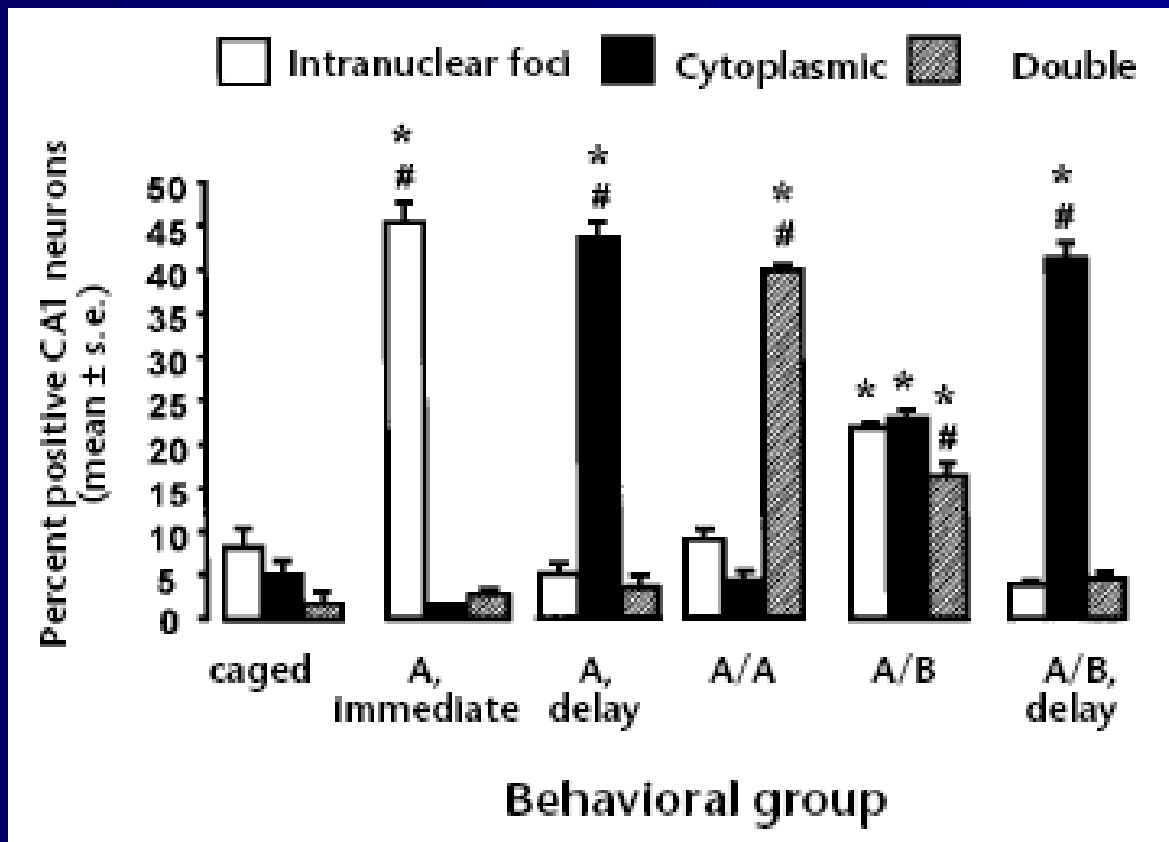
## Cellular compartment analysis of temporal activity by FISH



- 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*



*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.

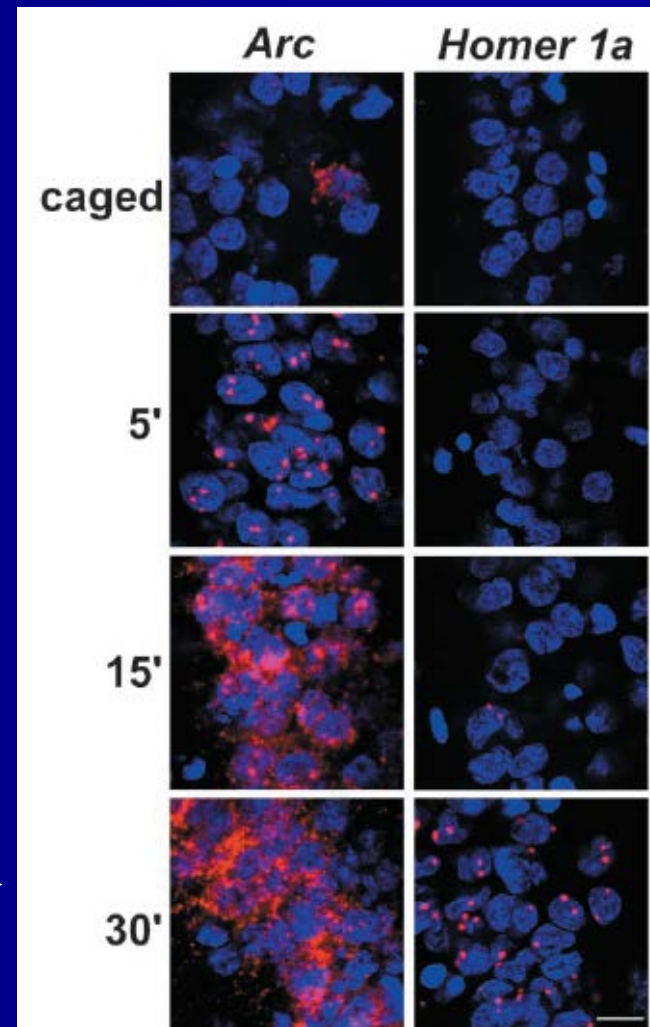
Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci



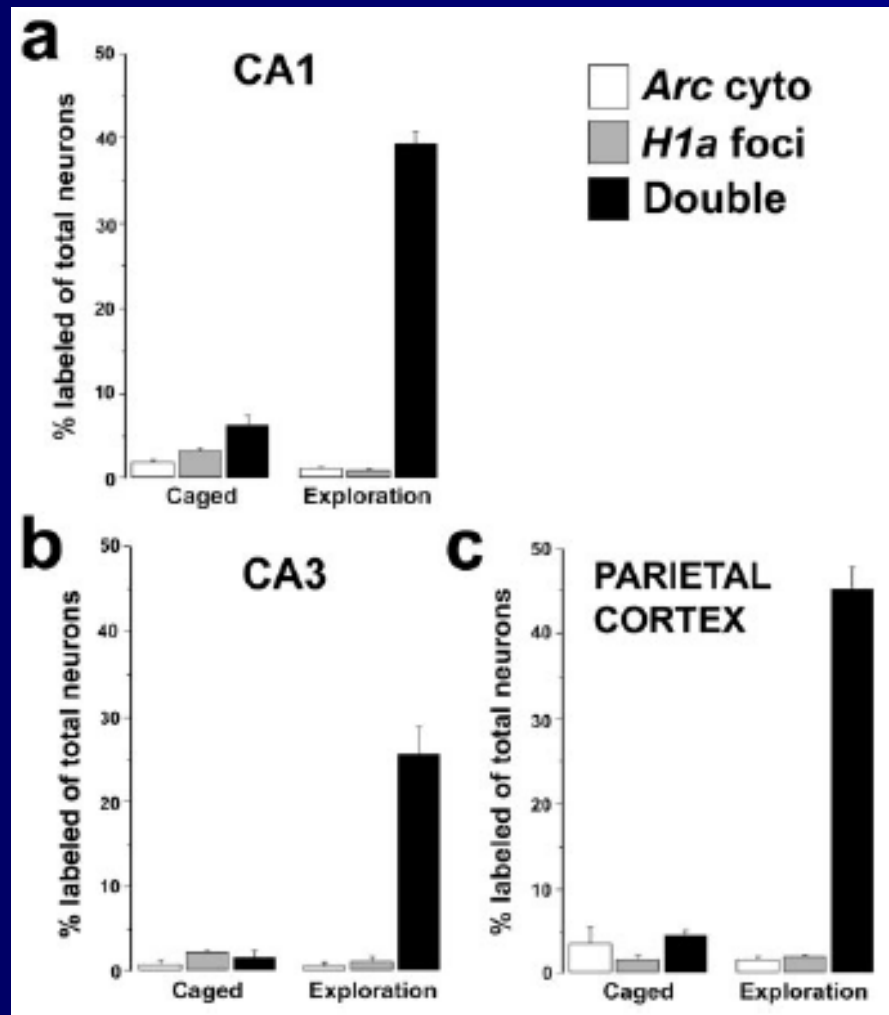
# Zpožděný výskyt signálu z *Homer1a*

- 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*. →

Vazdarjanova et al., 2002, J Neurosci

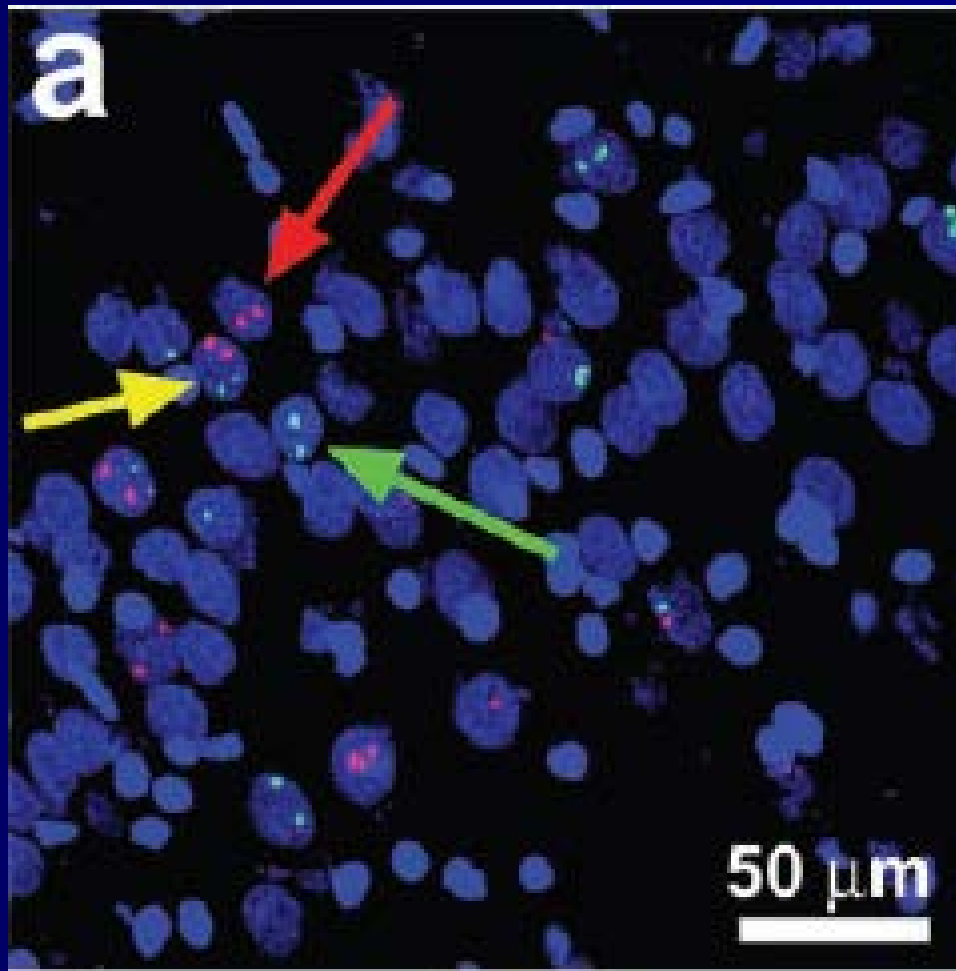


# INF *H1a* kolokalizuje s cytoplazmatickým *Arc*



- 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

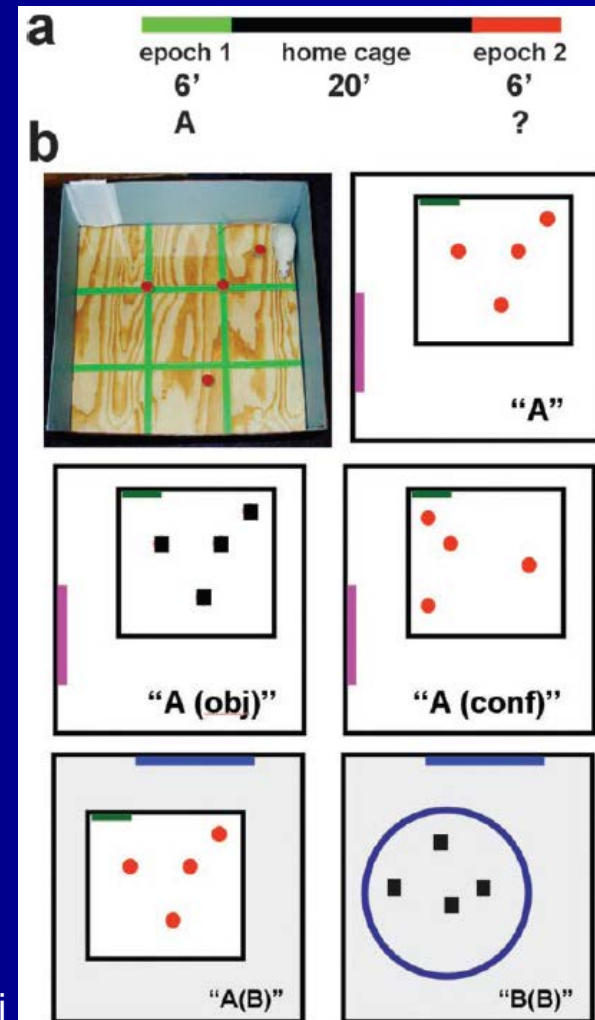


*Homer1a* (zelený INF) značí neurony aktivní během první epizody ~25-30 min před smrtí zvířete. *Arc* (červený INF) značí neurony aktivní během druhé epizody bezprostředně před usmrcením. Double-positivní neurony byly aktivní během obou epizod.

# Změny v prostředí

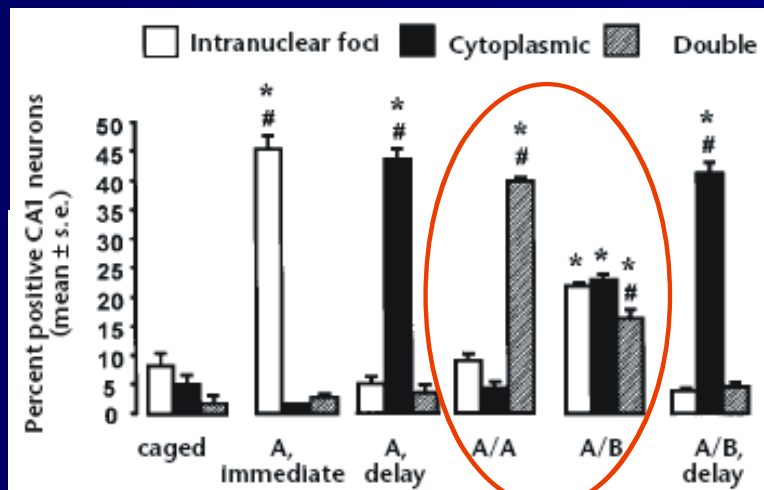
- Zvířata byla vypuštěna na 6 min jednou v prostředí A, navrácena do svých klecí, a 20 min později podruhé vypuštěna v tomtéž prostředí A, v modifikovaném prostředí A' buď s jinými objekty Aobj, s jiným uspořádáním stejných objektů Aconf, anebo s jinými vzdálenými orientačními značkami Ab, anebo v úplně jiném prostředí B.
- Kontrolní zvířata (caged controls - CC) zůstala ve svých klecích po celou dobu.

Vazdarjanova and Guzowski, 2004, J Neurosci

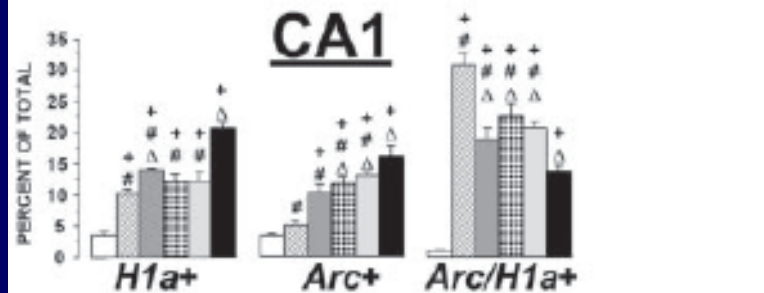




# CA1 a CA3 reagují odlišně na změny v prostředí



Guzowski et al., 1999, Nat Neurosci

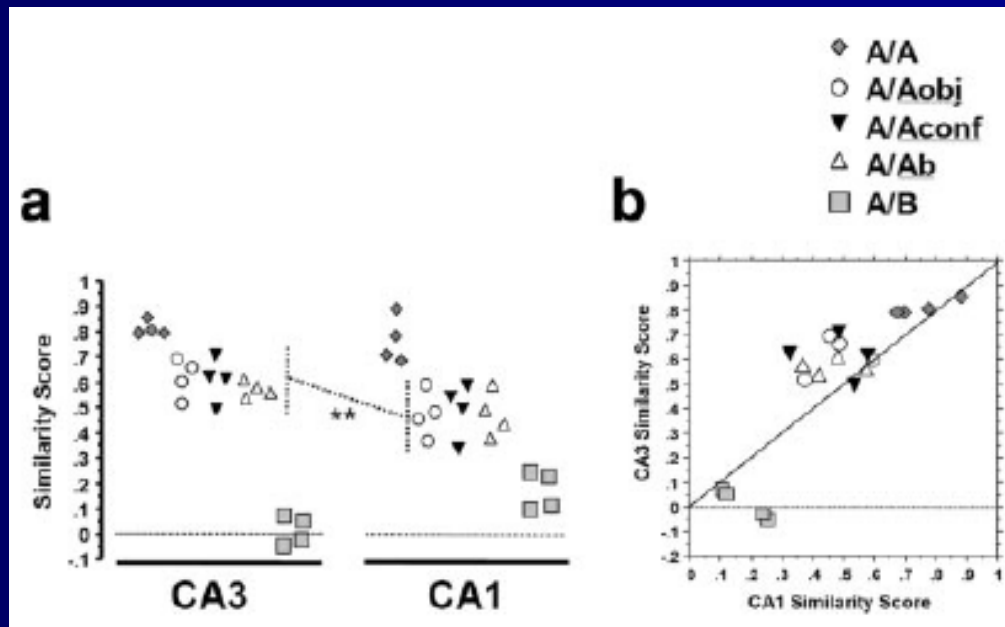


Vazdarjanova and Guzowski, 2004, J Neurosci

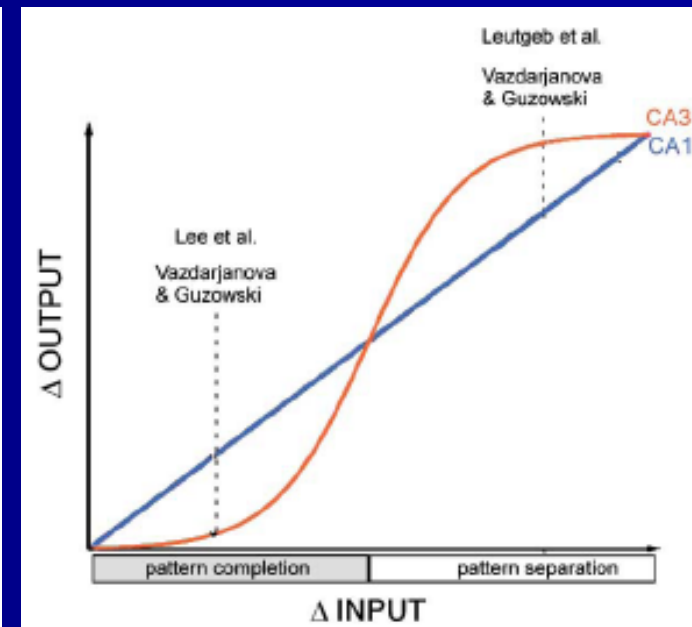
- Ve stejném prostředí (A/A) se aktivní neuronální skupiny (neural ensembles) v CA1 i v CA3 z valné části překrývají.
- V různých prostředích (A/B) jsou aktivní skupiny v CA3 statisticky nezávislé, zatímco v CA1 nadále přetrvává jistá podobnost skupin.
- Při mírných změnách (A/A') je podobnost vyšší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

# Dynamika 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

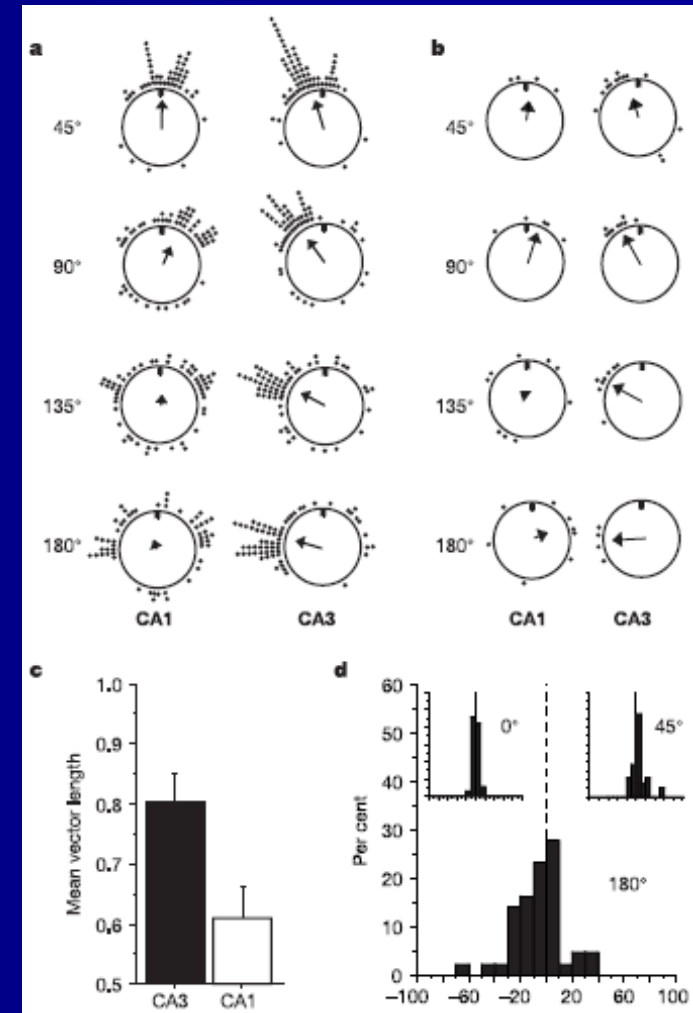
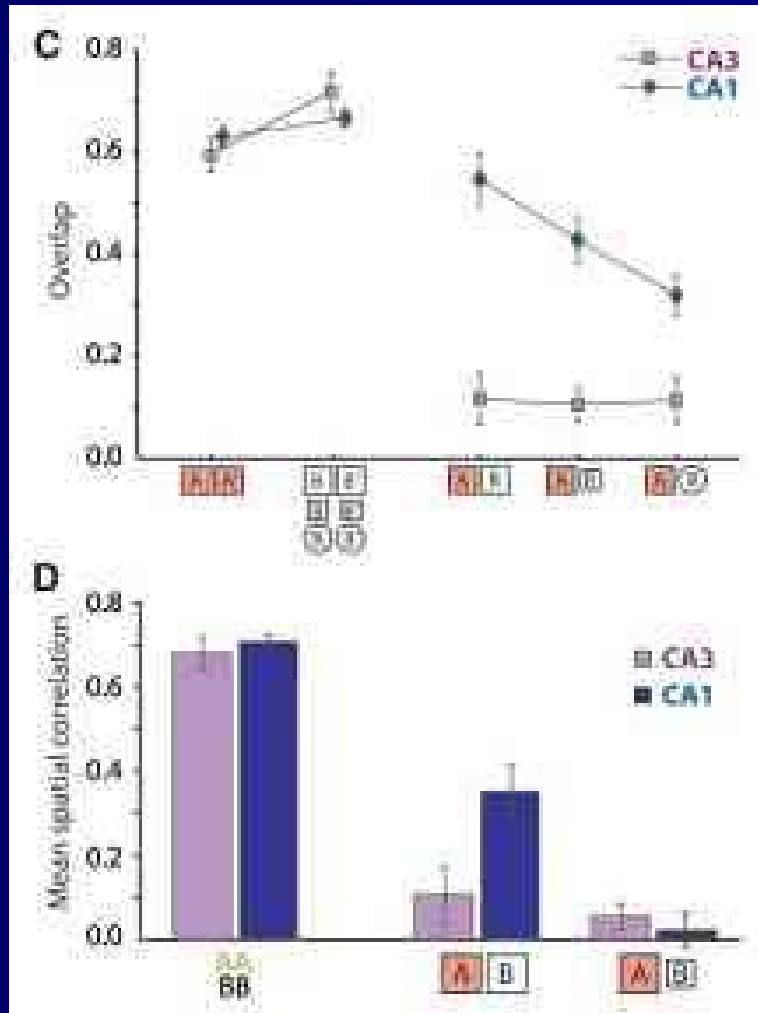


Guzowski et al., 2004, Neuron

# Podobně se liší i neuronální aktivita

Leutgeb et al., Science, 2004

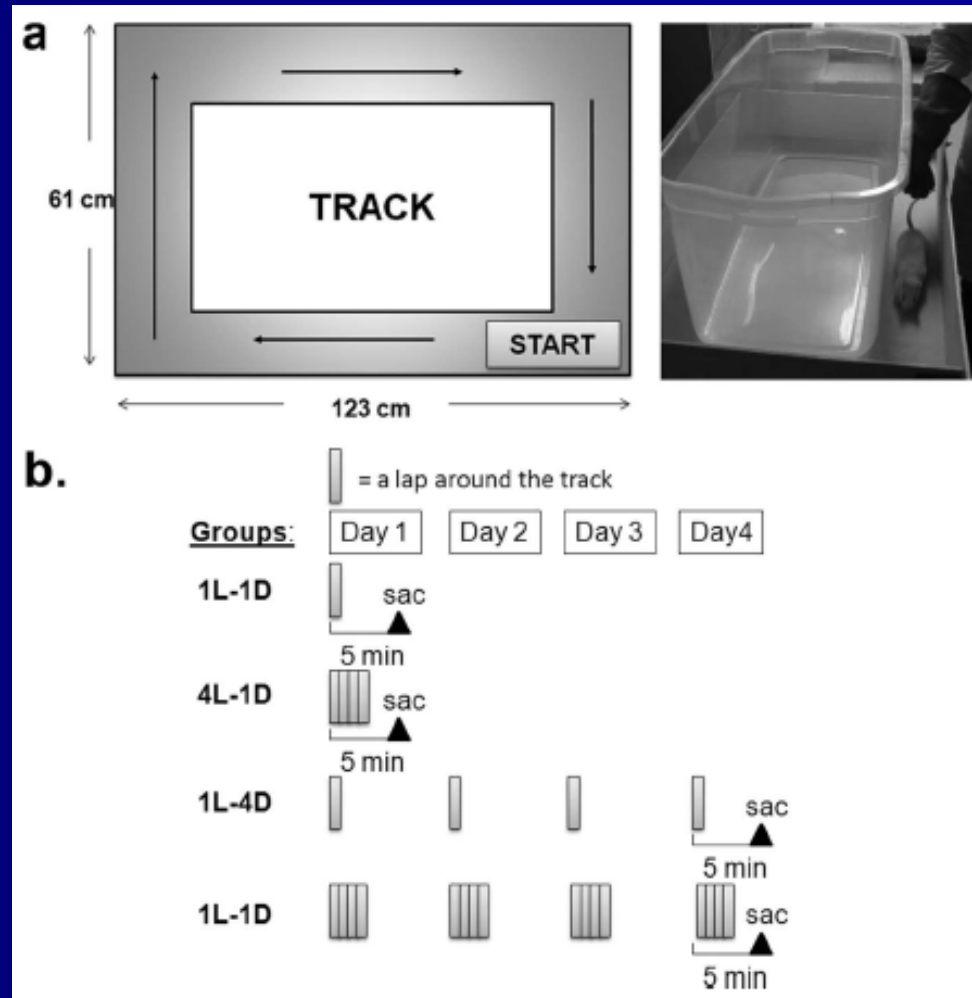
Lee et al., Nature, 2004



# Kolik aktivity je třeba ke spuštění exprese *Arc*?

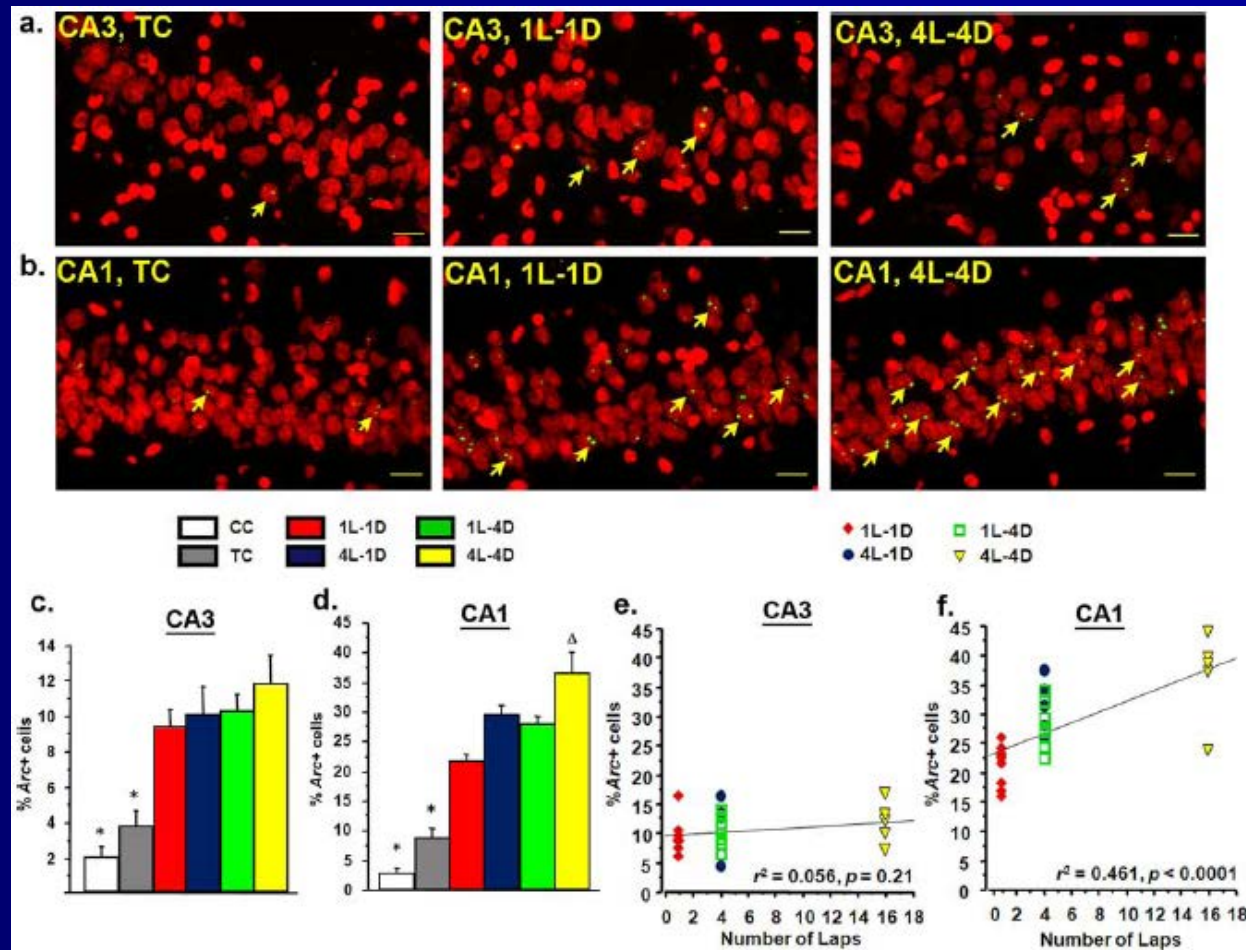
- Track maze – potkan projde každým místem právě jednou v každém kole
- Je aktivita place cells vyvolaná jedinou návštěvou „place field“ dostatečná ke spuštění exprese *Arc*?
- Posílí opakování tuto expresi?

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.

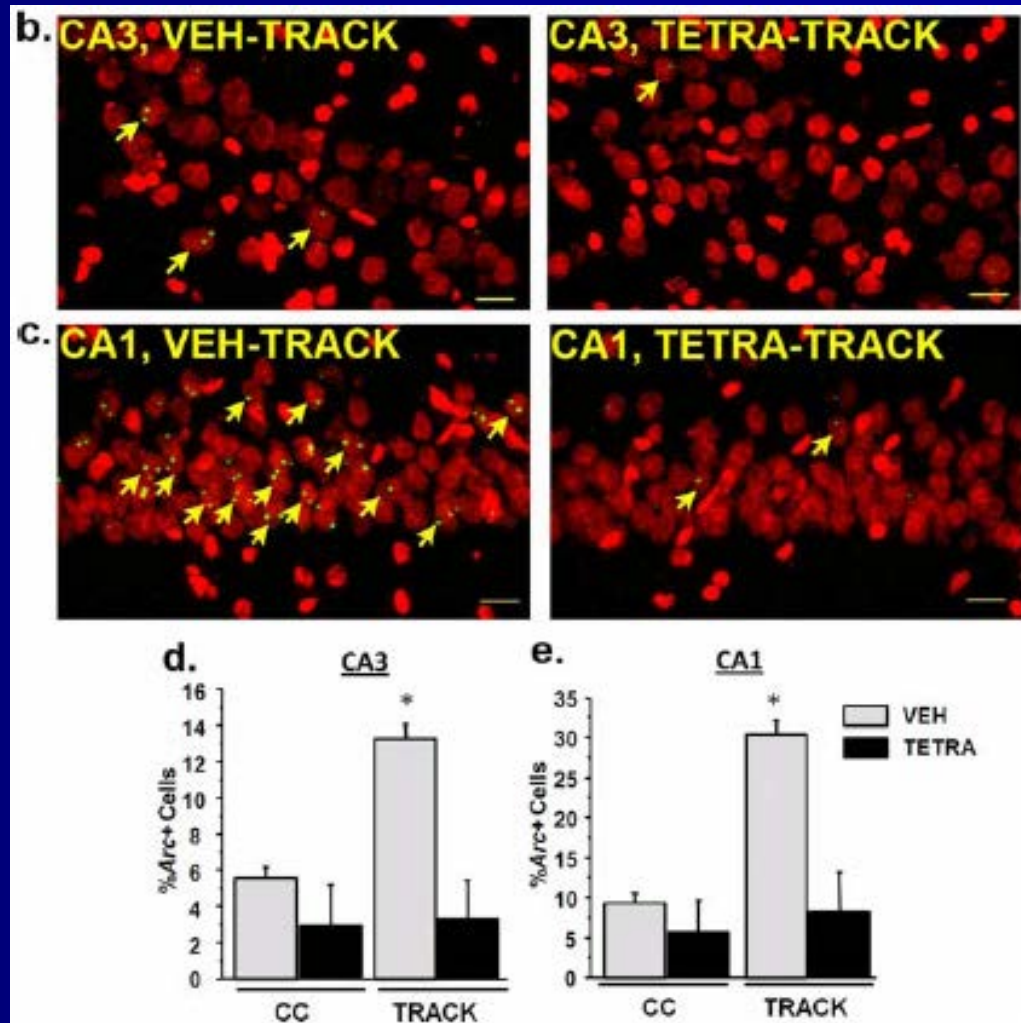




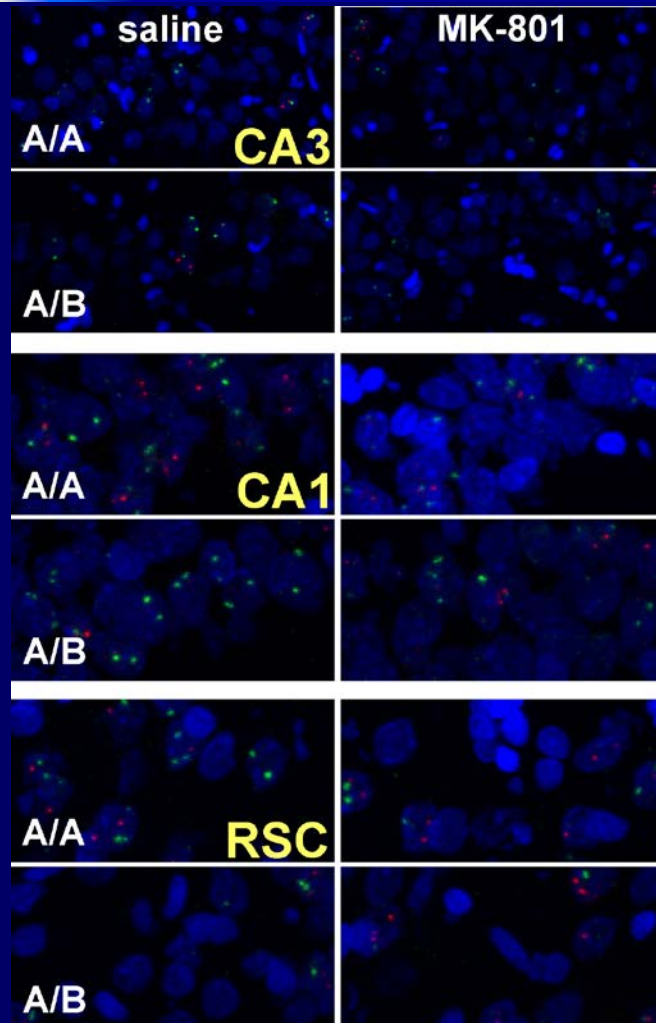
# Vede aktivita place cells vždy ke spuštění exprese *Arc*?

- 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



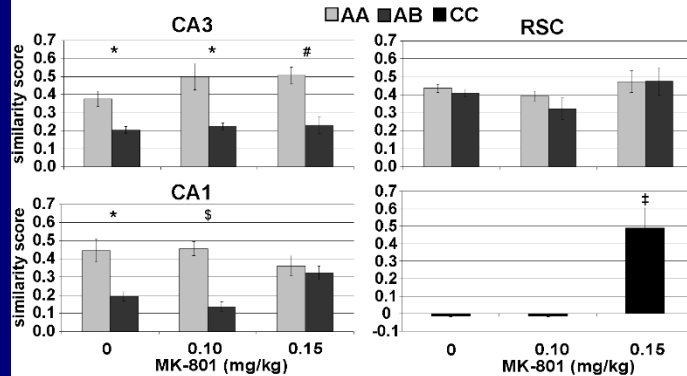
# Hyperassociation in a model of psychosis



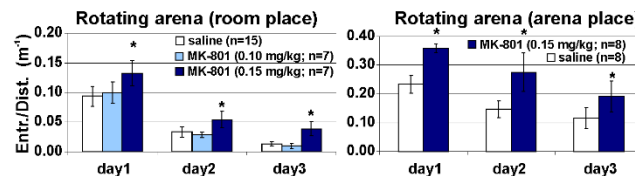
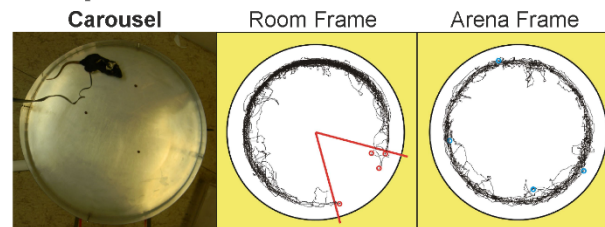
*Arc/Homer 1a* catFISH imaging of neuronal activity during repeated exploration of the same or different contexts.



MK-801 abolished ensemble code for spatial context in CA1, but not in CA3 populations of IEG positive neurons.



MK-801 impaired coordination of discordant information.



# 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/>



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 →

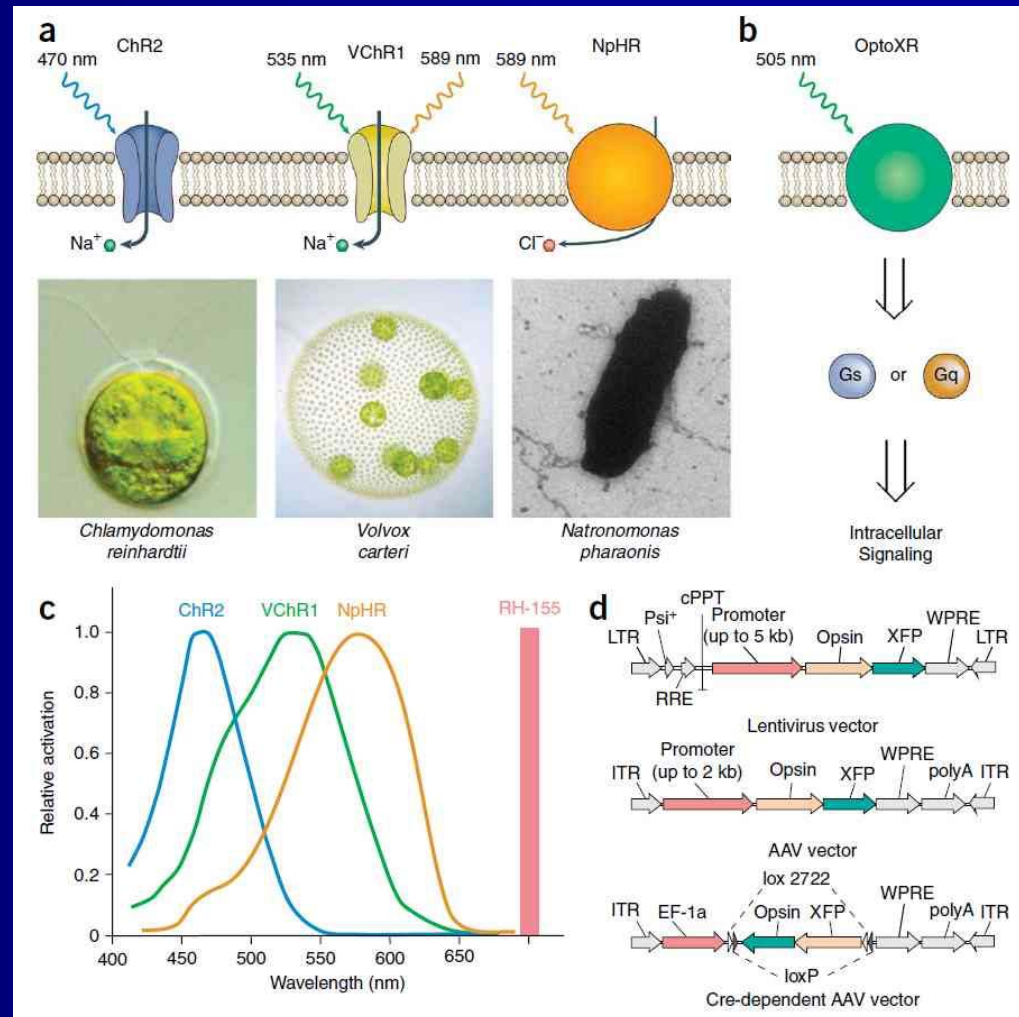
nature  
**protocols**  
optogenetics  
protocols →

2012 Analysis  
**nature methods**  
Quantitative Opsin  
Properties →

# Optogenetika

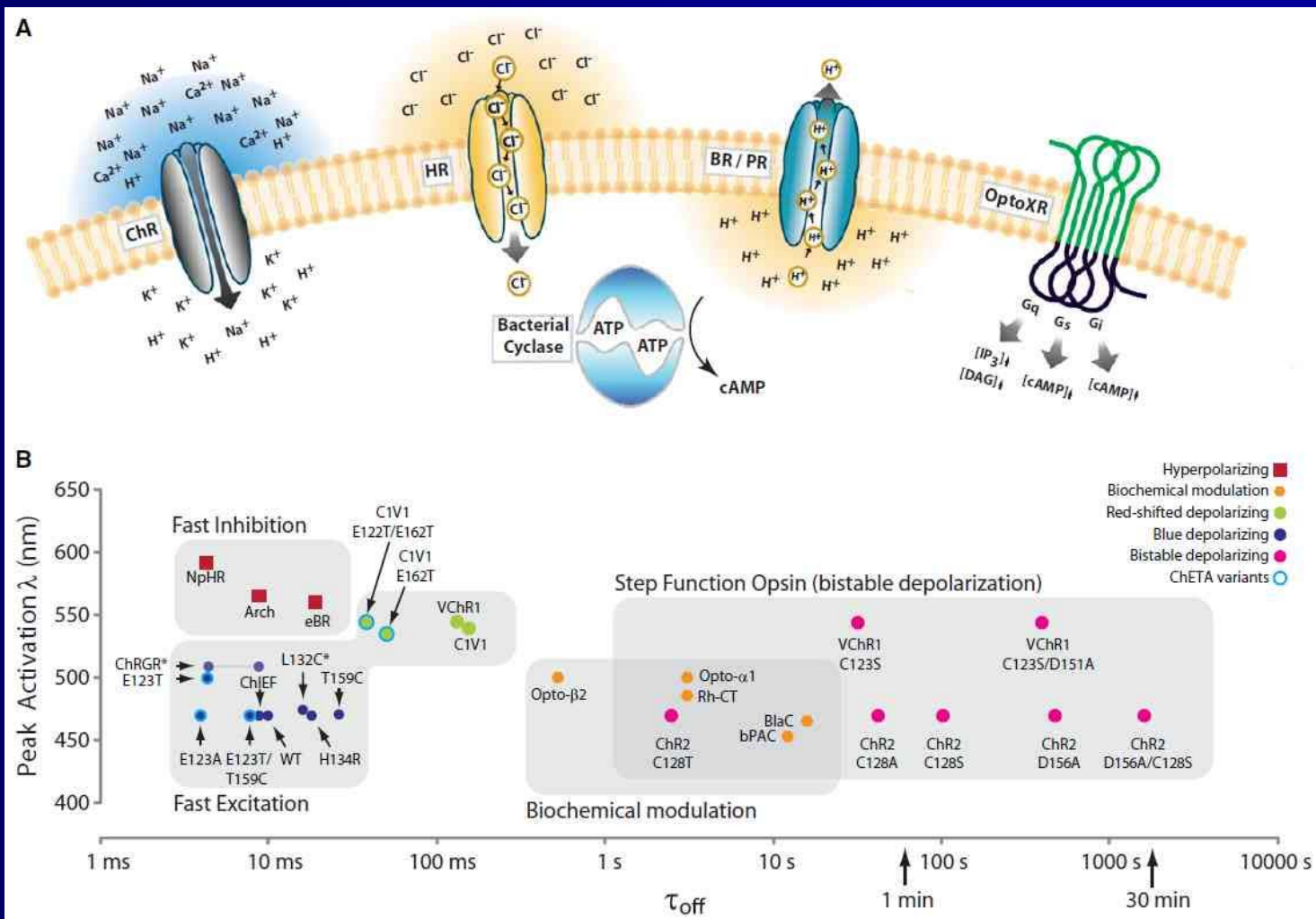
- Kationtový kanál
- Chloridová pumpa
- Světločivný chimerický GPCR
- Kombinace různých vlnových délek
- Virové vektory
- Kombinace s dalšími transgeny (Cre rekombináza, tetracycline transactivator (tTa))

Zhang et al., 2010, Nature Prot

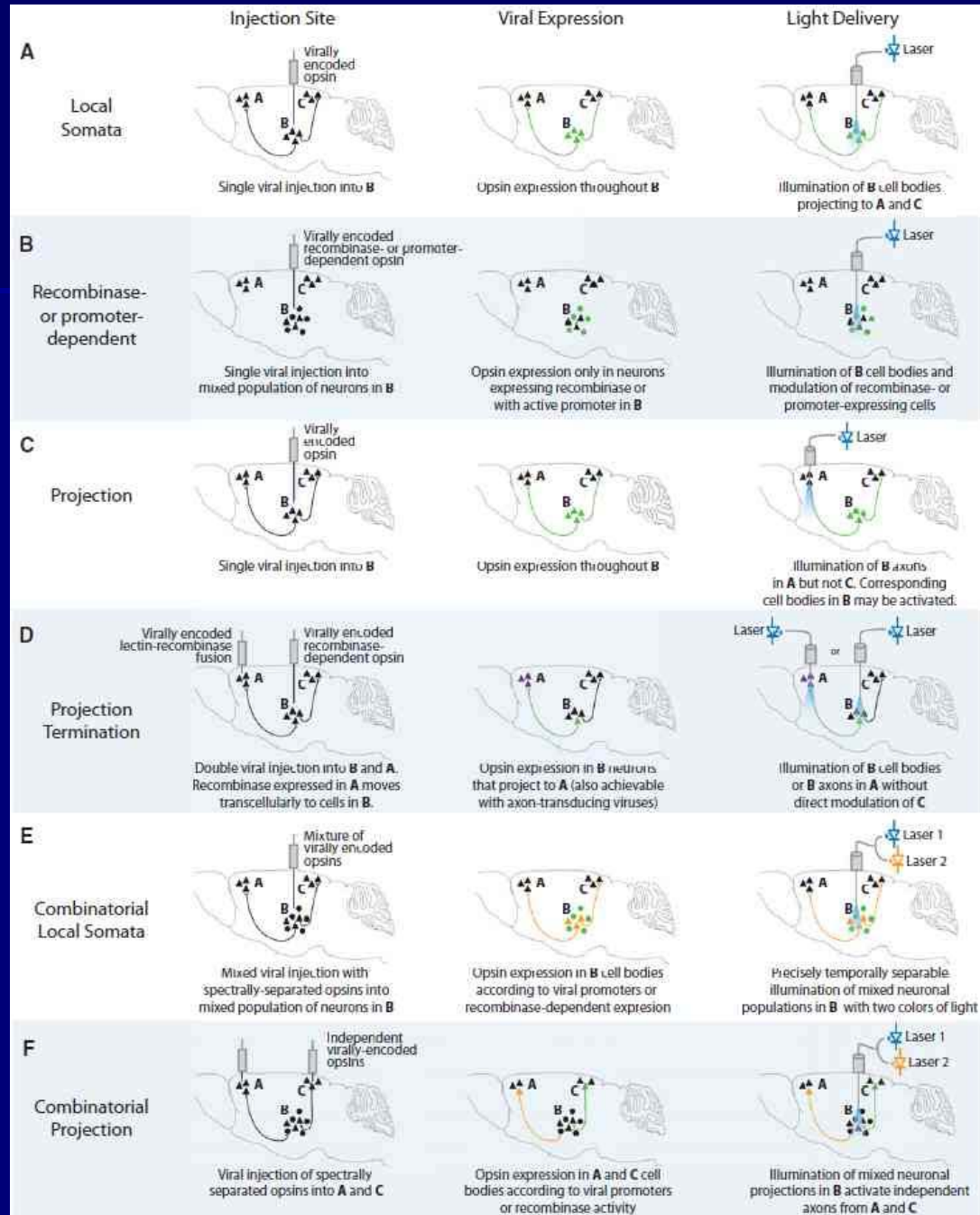


# Opsiny

Yizhar et al., 2011, Neuron



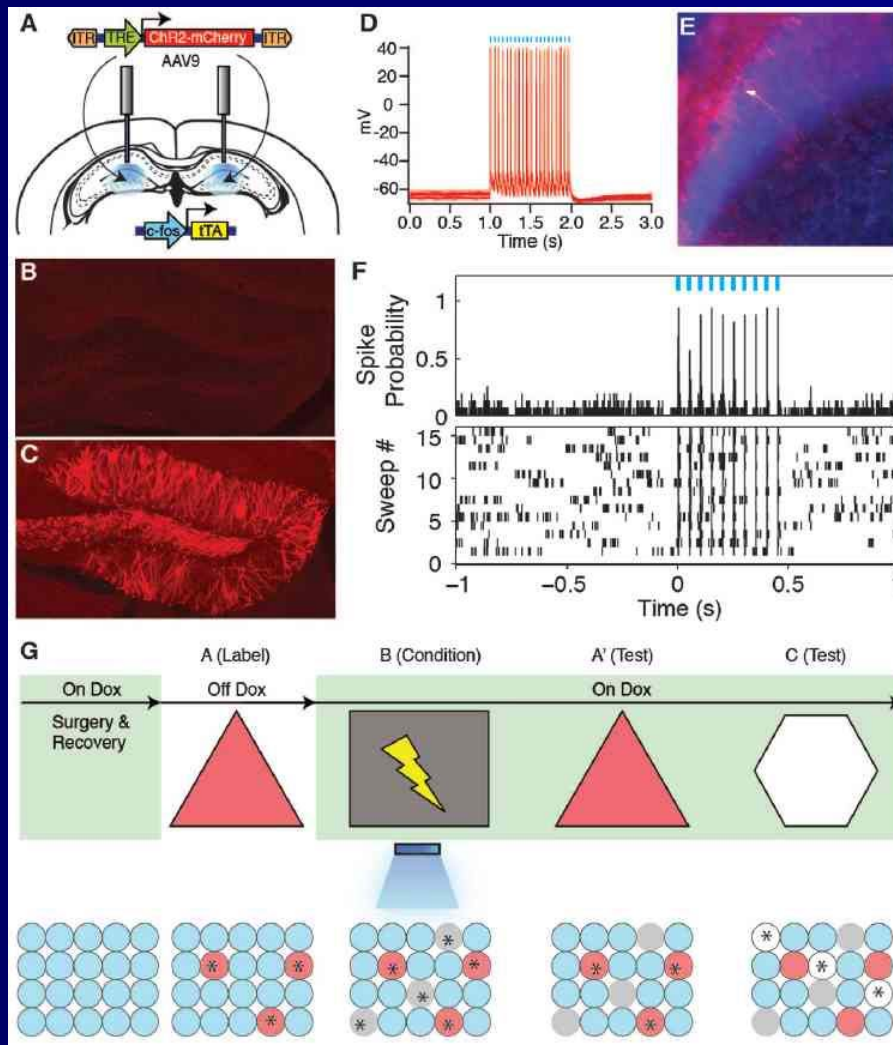
# Targeting



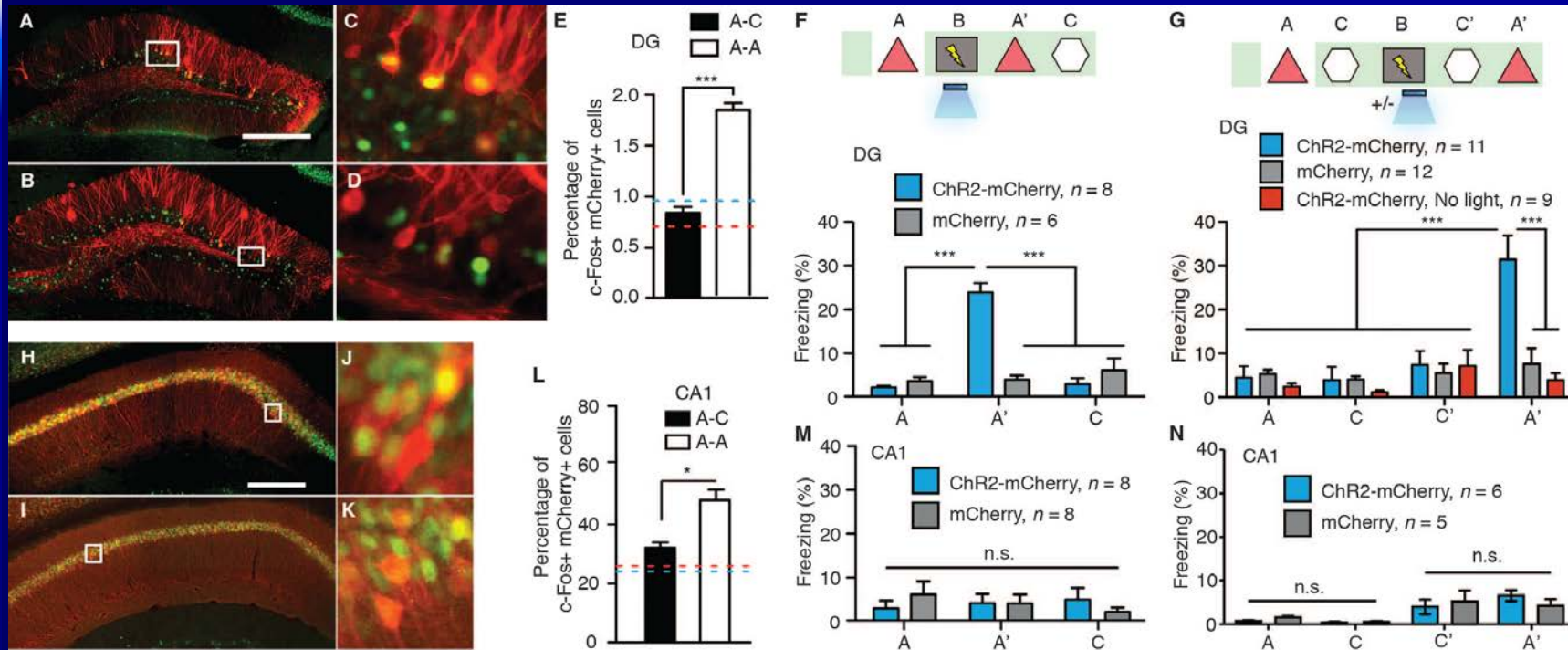


# Creating false memories

Ramirez et al., 2013, Science



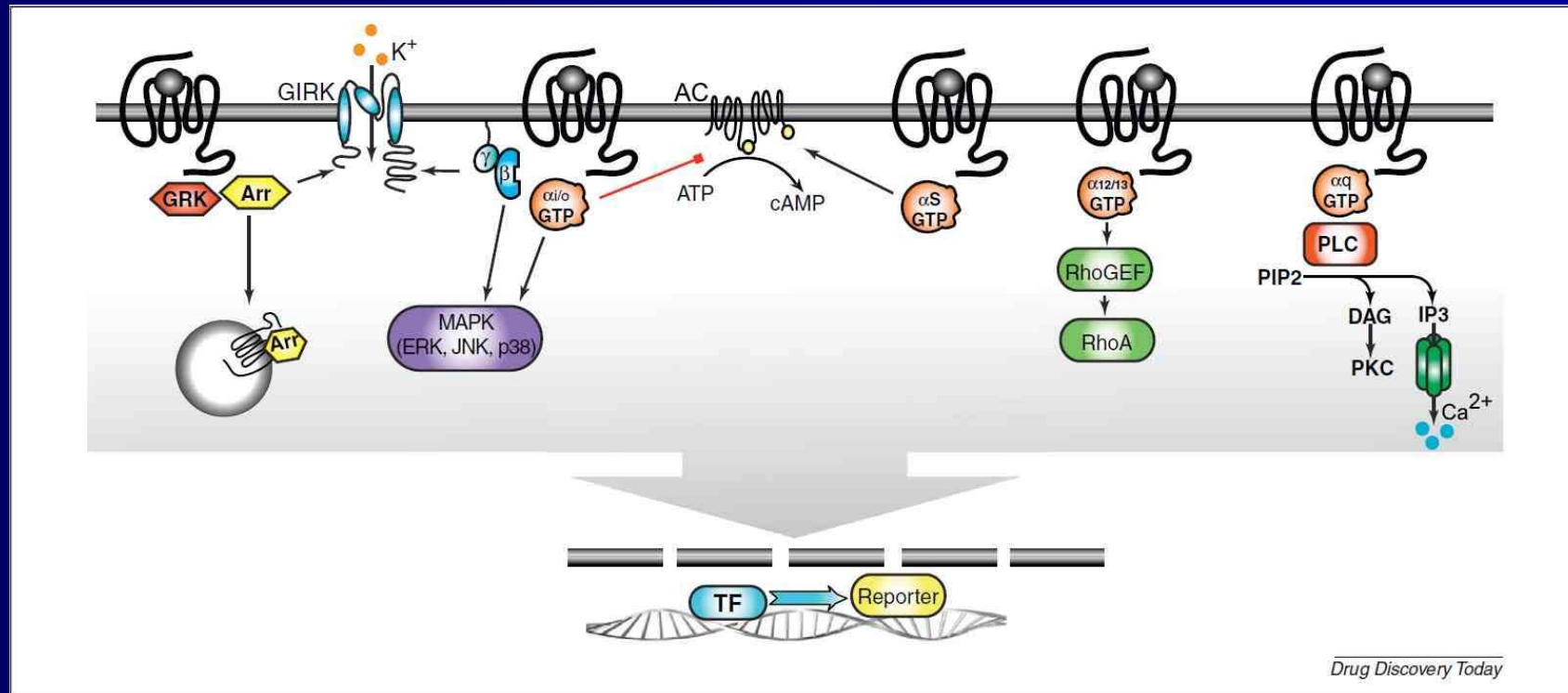
# Creating false memories



Ramirez et al., 2013, Science

# Chemogenetika - GPCR

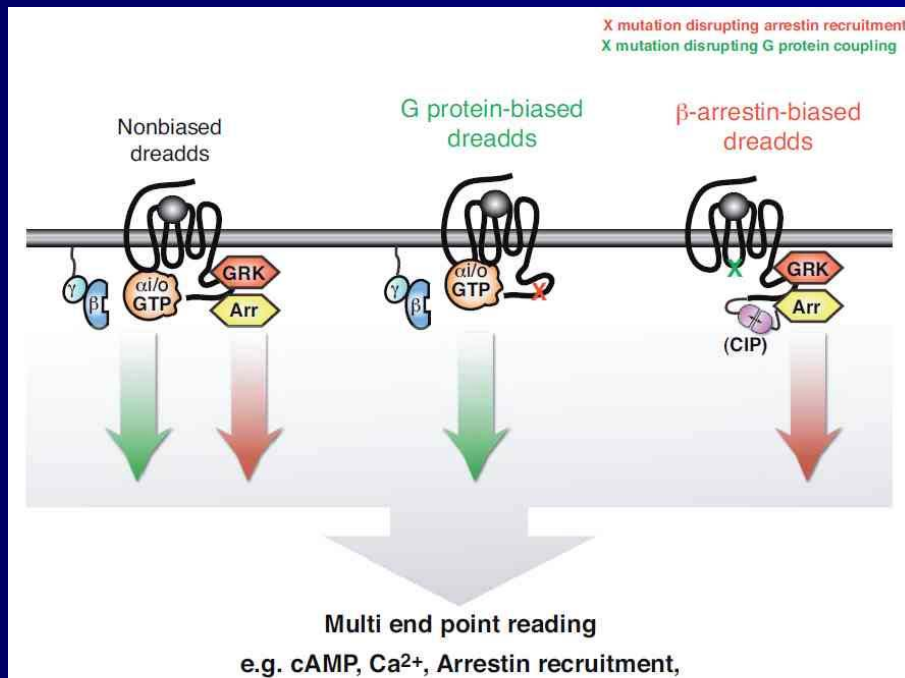
## G-protein-coupled receptors



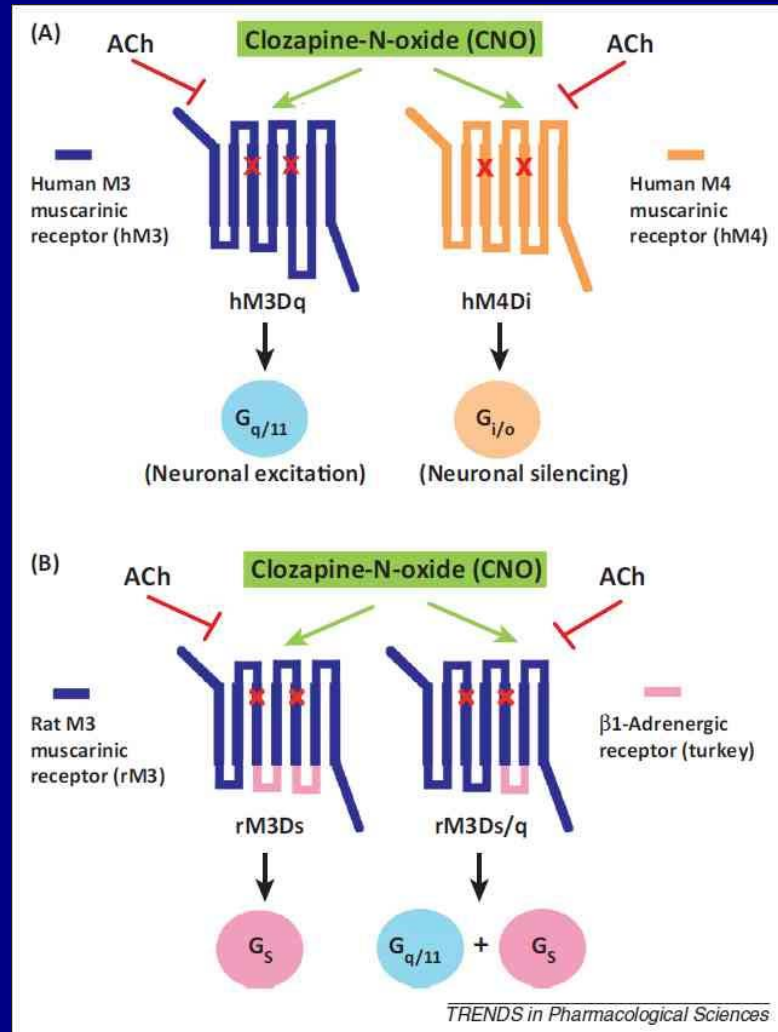
# Chemogenetika - DREADDs

Wess et al., 2013, Trends Pharm Sci

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

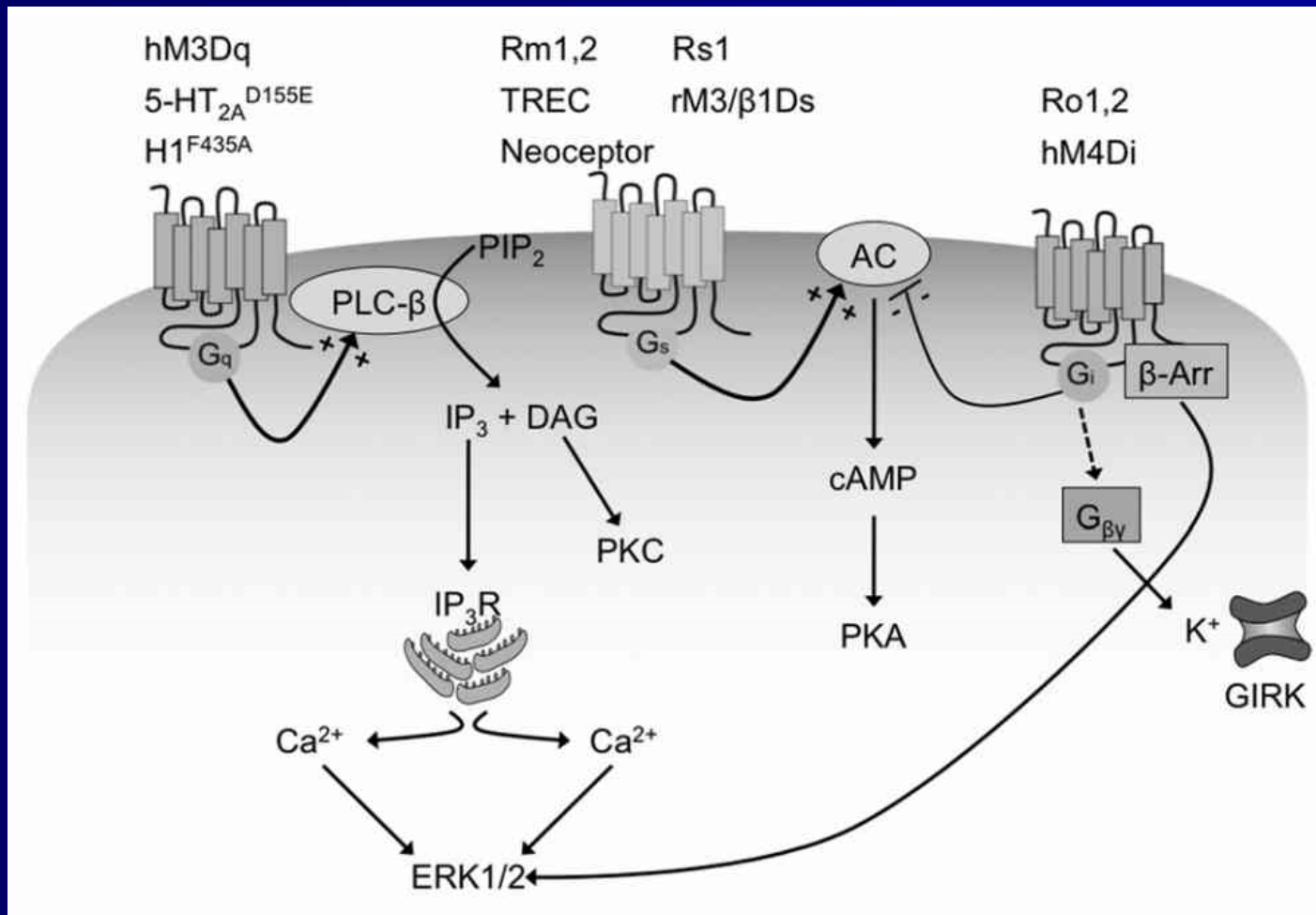


Drug Discovery Today

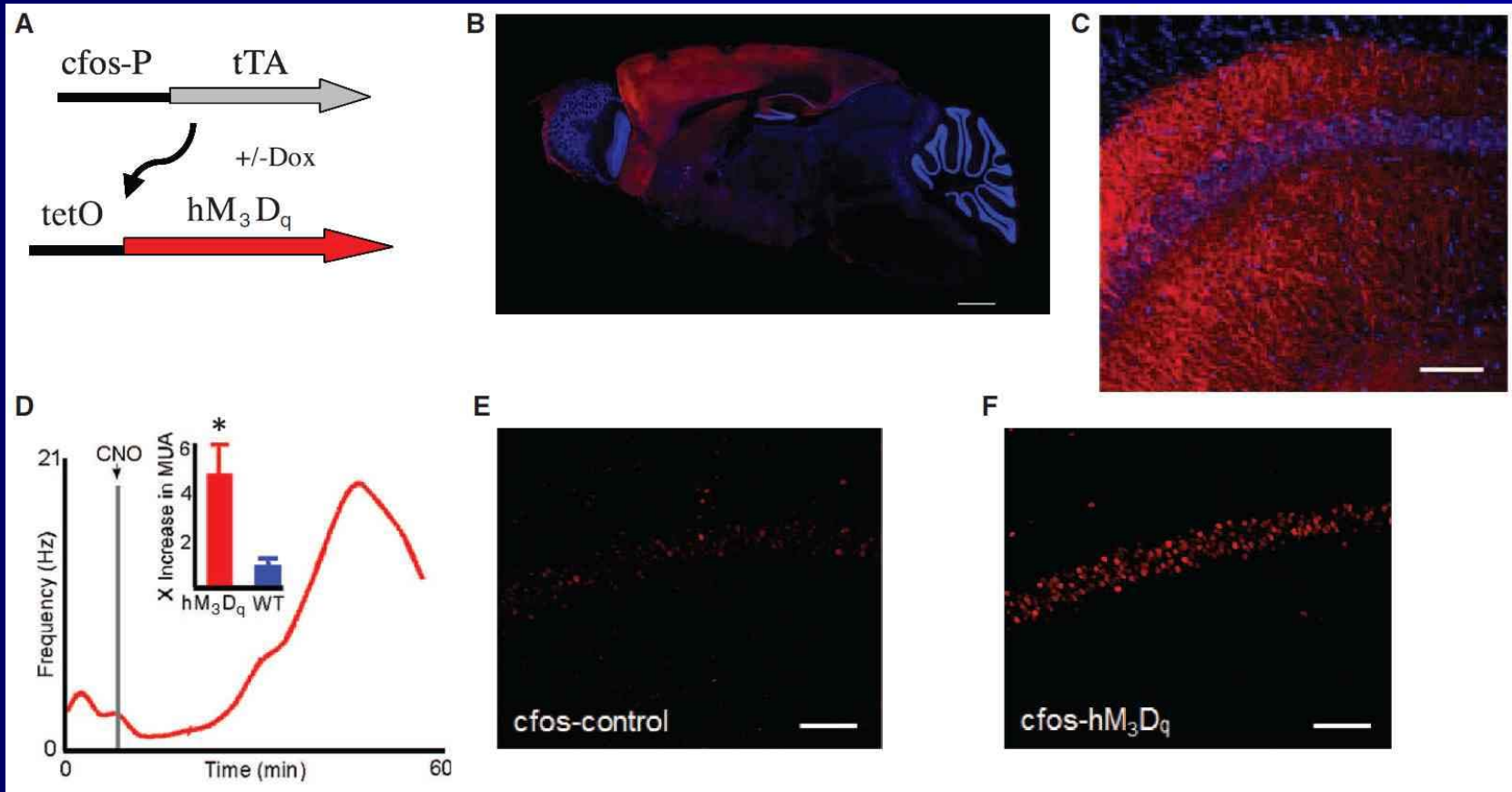




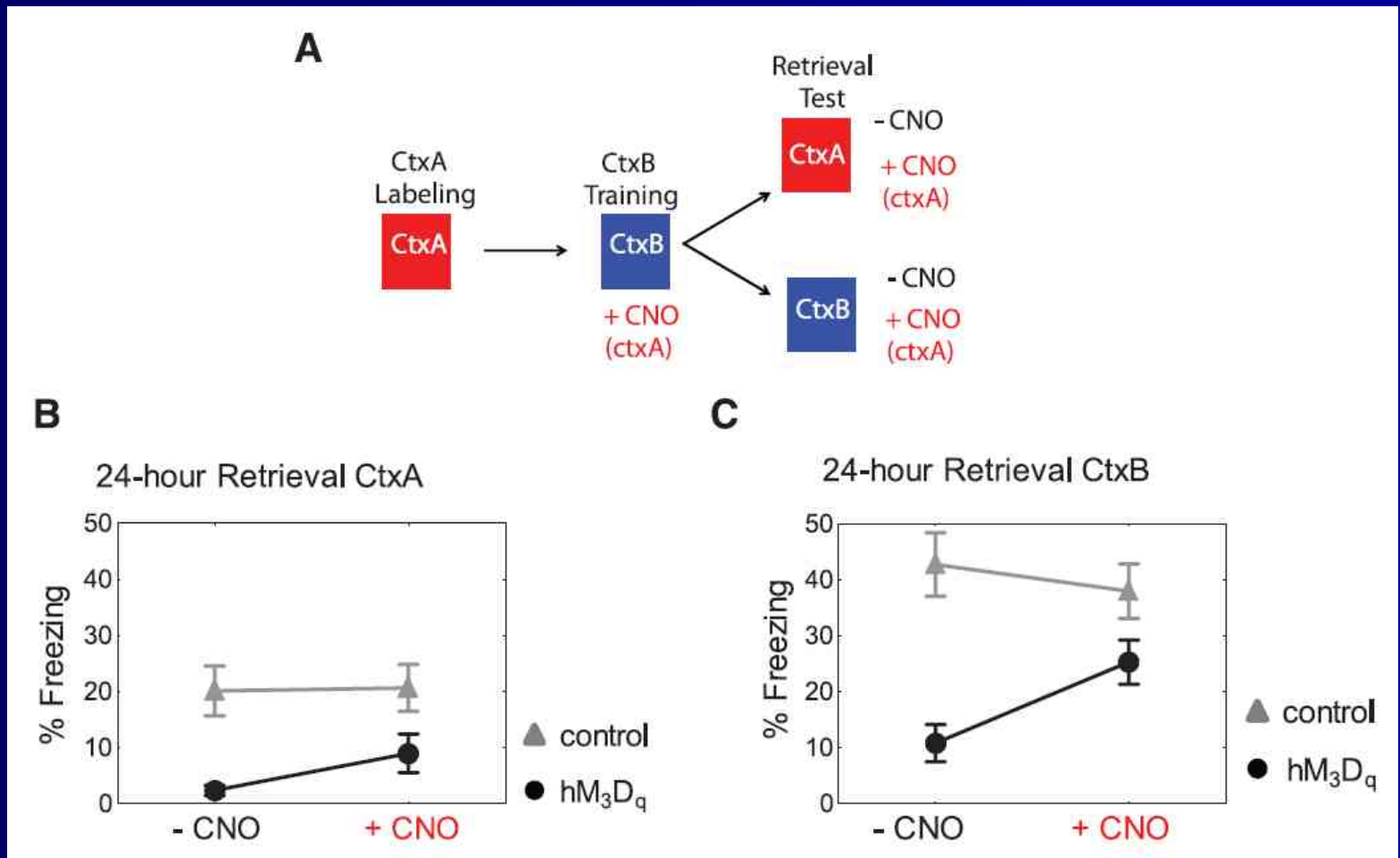
# hM3Dq - hM4Di



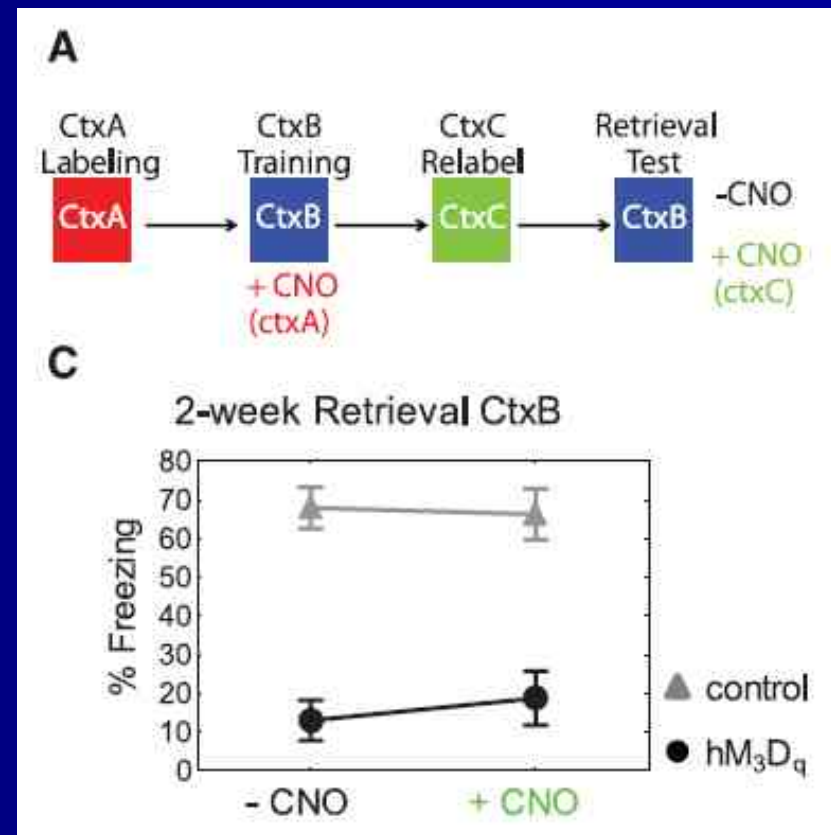
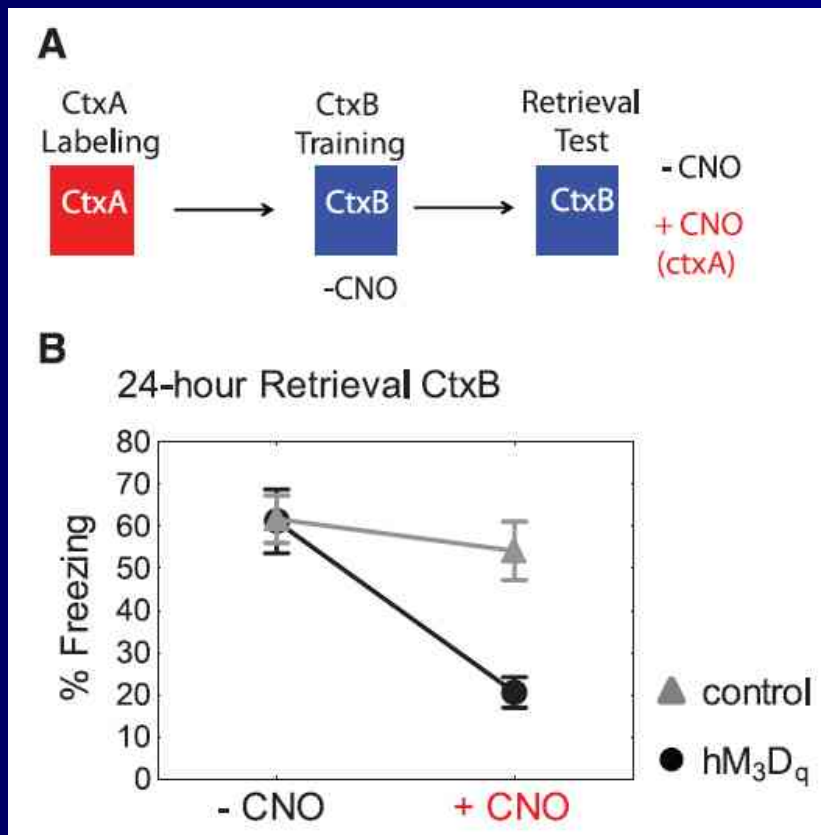
# Aktivace hM3Dq



# Synthetic memory trace



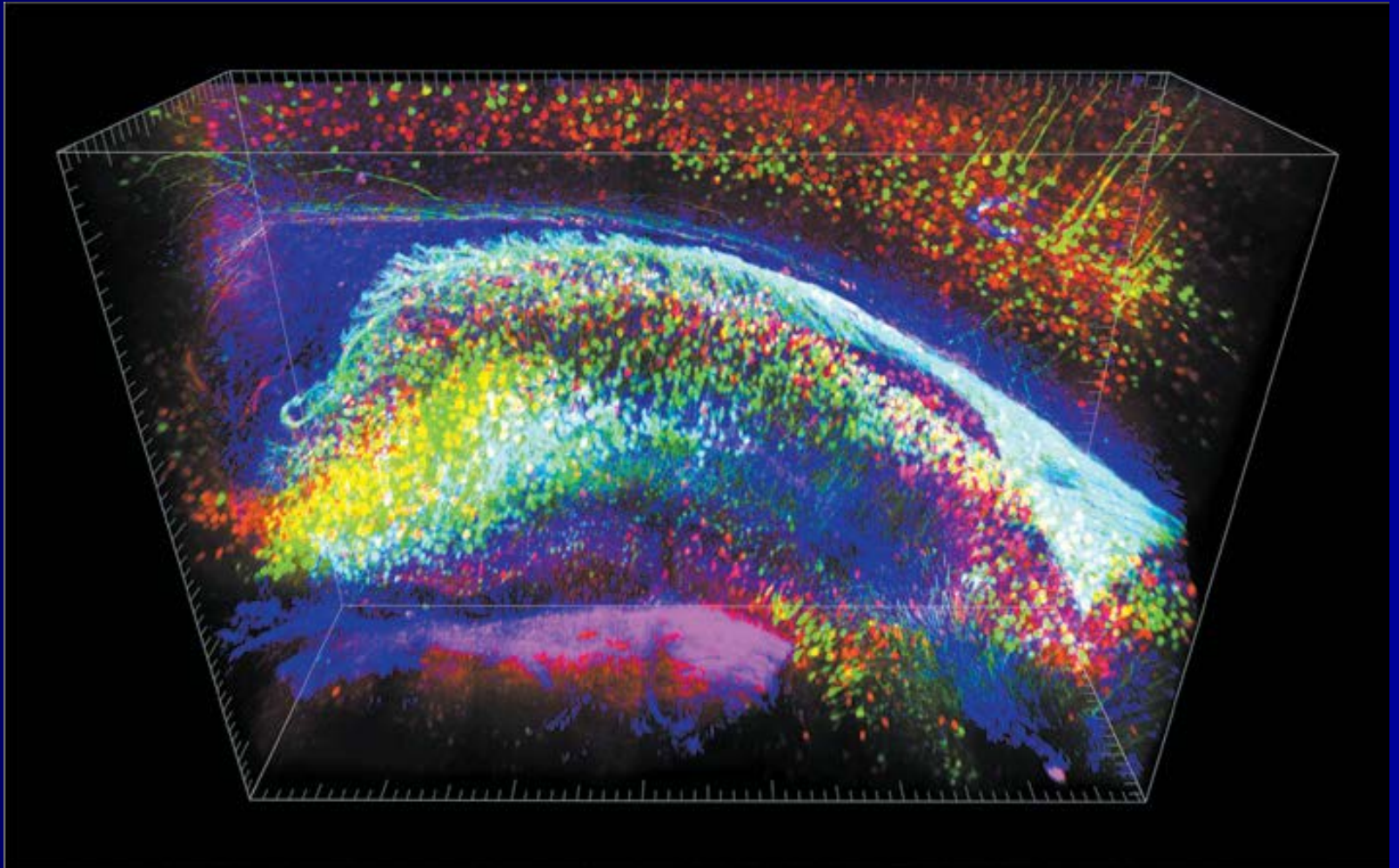
# Synthetic memory trace



# Pokročilé metody studia učení a paměti

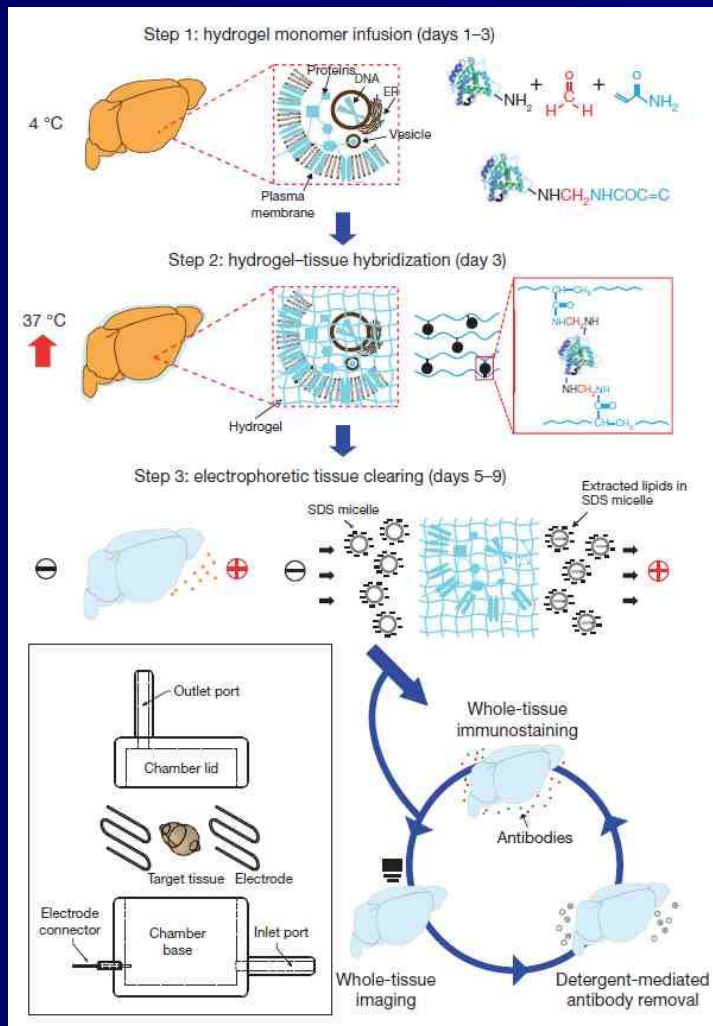
- Elektrofyzologie
  - Extracellular multiple single unit recording
  - Chronické nahrávání z pohyblivých zvířat
- Intervenční techniky
- IEG Imaging
- Optogenetika, chemogenetika
- Clarity - zprůhledňování

# Clarity





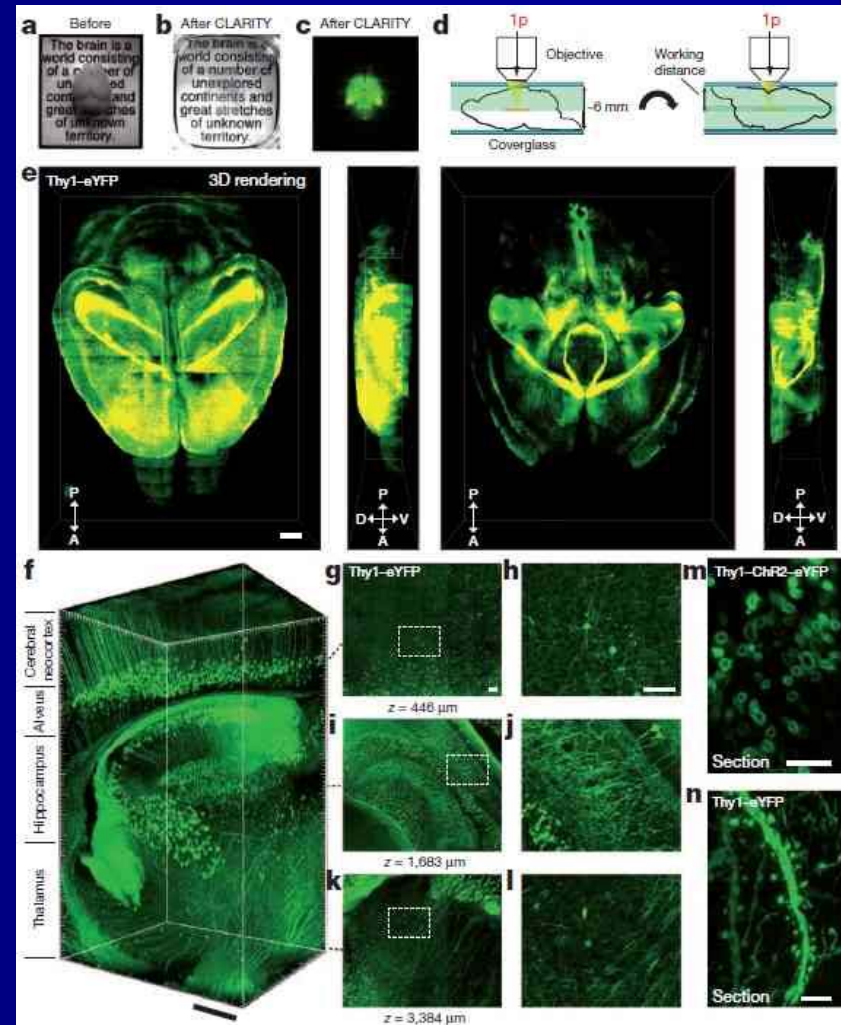
# Clarity – „Odmašťovna“



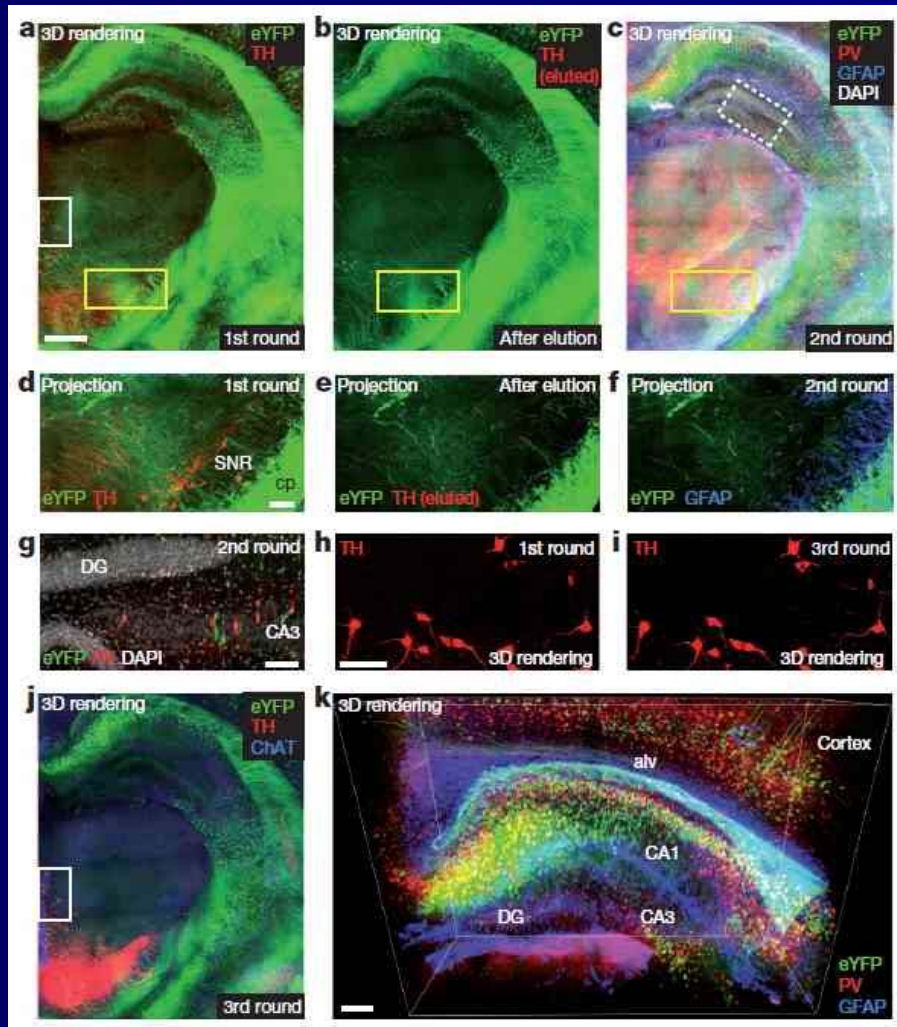
- Hlavní překážkou šíření světla tkání jsou lipidy.
- Jejich odstranění po předchozí fixaci hydrofilních biomolekul v hydrogelové mřížce zprostupňuje též tkáň/vzorek pro makromolekuly (protilátky apod.).

# Clarity

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



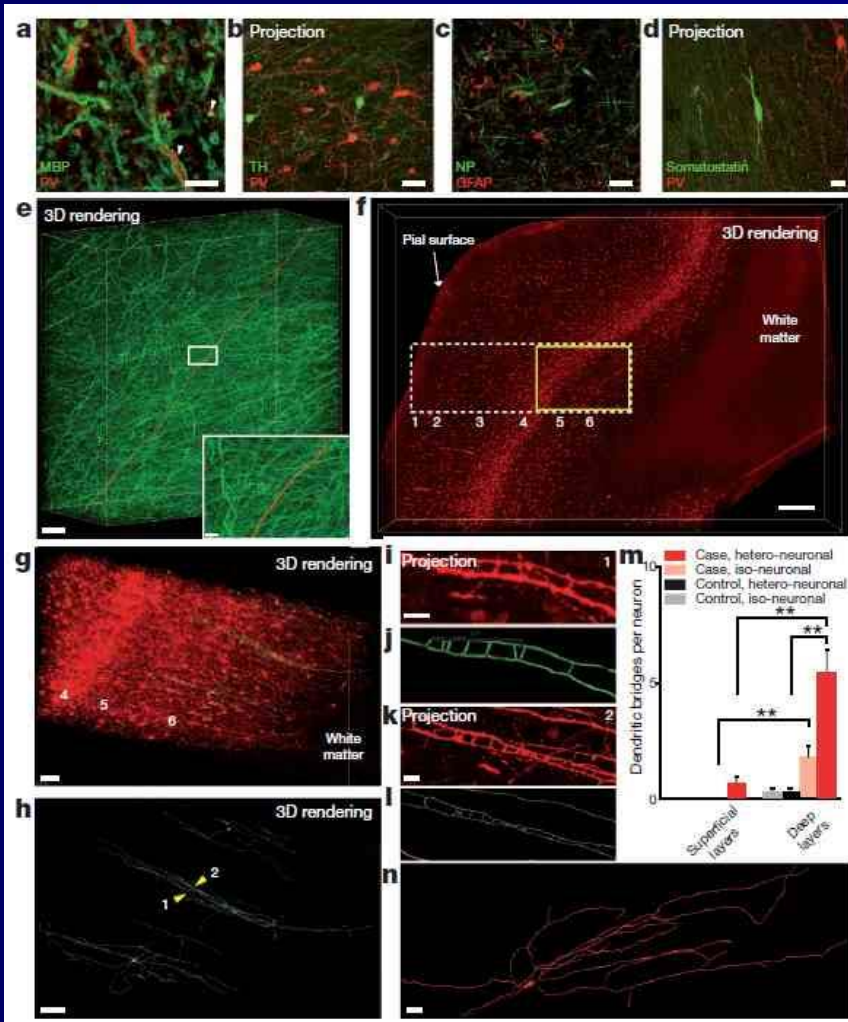
# Clarity



- Clarity umožňuje opakované barvení – skutečně trvalý preparát



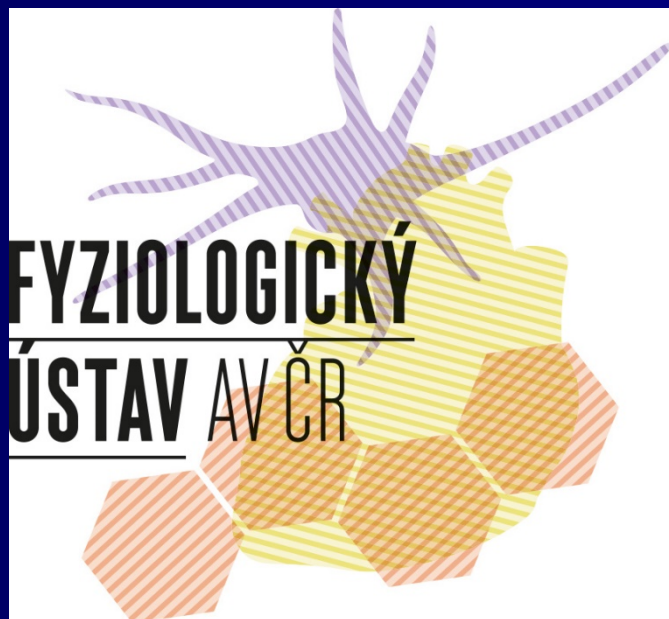
# Clarity



- 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>