

Ο ρόλος των δευτέρων αγγελιοφόρων στη διαδικασία της μνήμης – μια προσπάθεια κατανόησης των μοριακών μηχανισμών

Στυλιανή Ζησοπούλου

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών στις Βασικές Νευροεπιστήμες, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περίληψη

Η μνήμη είναι μια πολύπλοκη νευρωνική διαδικασία, εξαρτάται από το χρόνο, υπόκειται σε μετατροπές και περιλαμβάνει τόσο λειτουργικές όσο και δομικές αλλαγές των συνάψεων των κυκλωμάτων που χρησιμοποιεί. Διακρίνεται σε short term memory και σε long term memory, οι οποίες αποτελούν δύο ανεξάρτητες αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες διαδικασίες. Η επαναλαμβανόμενη εμπειρία κάνει πιο σταθερή τη μνήμη με το να μετατρέπει την short term memory σε long term memory. Η μετατροπή αυτή περιλαμβάνει γονιδιακή έκφραση, σύνθεση νέων πρωτεϊνών και δημιουργία νέων συνάψεων όπως θα δούμε αναλυτικότερα στη συνέχεια. Στην παρούσα μελέτη επιχειρείται μια προσπάθεια παρουσίασης των μοριακών μηχανισμών της μνήμης, με ιδιαίτερη έμφαση στο τμήμα εκείνο που αφορά τους δευτέρους αγγελιοφόρους, καθώς και η παρουσίαση ενδεικτικών τεχνικών μελέτης της, μέσα από μια αναδρομή στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία. Από τα ποικίλα νευρομεταβιβαστικά συστήματα και τις πολλαπλές περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη μνήμη, στην μελέτη αυτή παρουσιάζονται επιλεκτικά οι δράσεις της σεροτονίνης και του γλουταμικού οξέος σε απλές μορφές μνήμης, όπως το sensitization, αλλά και σε πιο πολύπλοκες, όπως στους μηχανισμούς παραγωγής του LTP στον ιππόκαμπο.

Εισαγωγή

Συναπτικοί Υποδοχείς

Οι συναπτικοί υποδοχείς έχουν δύο κύριες λειτουργίες: την αναγνώριση συγκεκριμένων νευρομεταβιβαστών (transmitters) και την ενεργοποίηση των «ενεργοποιητών» (effectors). Ο υποδοχέας αρχικά αναγνωρίζει και συνδέει τον νευρομεταβιβαστή από το εξωκυττάριο περιβάλλον και στη συνέχεια, ως συνέπεια αυτής της σύνδεσης, ο υποδοχέας μεταβάλλει το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης και τη βιοχημική κατάσταση του κυττάρου. Οι συναπτικοί υποδοχείς που είναι γνωστοί μέχρι σήμερα, μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο που οι δύο λειτουργίες της σύνδεσης και της ενεργοποίησης συνδέονται.

Ο πρώτος τύπος, οι *ιοντοτροπικοί υποδοχείς (ionotropic receptors)*, συνδέονται άμεσα με ιονικά κανάλια. Οι λειτουργίες της σύνδεσης και του ενεργοποιητή πραγματοποιούνται από διαφορετικές περιοχές του ίδιου μακρομορίου (Εικ.1a).

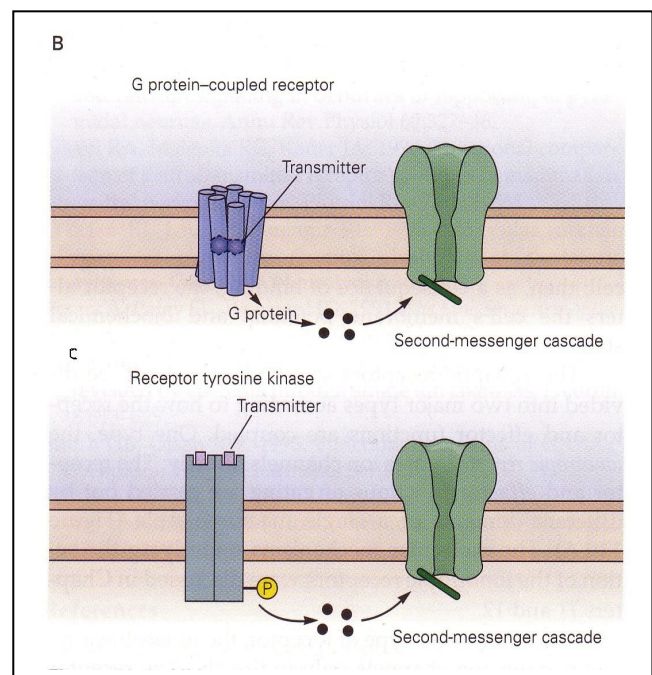
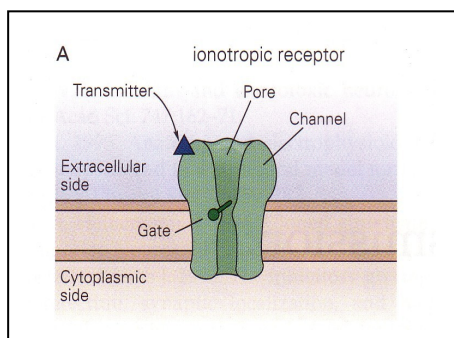
Ο δεύτερος τύπος υποδοχέων είναι οι *μεταβοτροπικοί υποδοχείς (metabotropic receptors)* οι οποίοι συνδέονται έμμεσα με τα ιονικά κανάλια. Οι λειτουργίες της σύνδεσης και του ενεργοποιητή πραγματοποιούνται από διαφορετικά μόρια. Σε αυτών τον τύπο των υποδοχέων διακρίνουμε δύο οικογένειες: τους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G protein-coupled receptors) (Εικ. 1b, 2) και τους υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης (receptor tyrosine kinases) (Εικ. 1c).

Παράρτημα 1- G πρωτεΐνες

Οι G πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με ένα νουκλεοτίδιο γουανίνης. Δεν είναι ενδομεμβρανικές πρωτεΐνες παρά το γεγονός ότι συνδέονται με την έξω πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Βρέθηκε ότι αποτελούνται από τρεις υπομονάδες: α, β και γ. Η α υπομονάδα συνδέεται χαλαρά με την μεμβράνη και είναι συνήθως ο φορέας που συνδέει τον υποδοχέα και το πρώιμο ένζυμο-ενεργοποιητή (primary effector enzyme). Σε αντίθεση, το σύμπλεγμα βγ είναι πολύ περισσότερο στενά συνδεδεμένο με την μεμβράνη από ότι η α υπομονάδα. Άλλωστε το σύμπλεγμα βγ μπορεί να επηρεάσει και άμεσα τα ιοντικά κανάλια.

Σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 12 διαφορετικούς τύπους α υπομονάδων. Οι G πρωτεΐνες με διαφορετικές α υπομονάδες έχουν διαφορετικές δράσεις και για το λόγο αυτό διαφορετικά ονόματα.

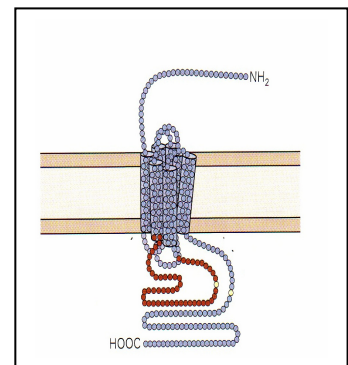
Τα μόρια των G πρωτεϊνών σε ένα κύτταρο είναι πολύ περισσότερα από τον αριθμό των υποδοχέων με τους οποίους συνδέονται. Καθώς ένας υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιήσει πολλές G πρωτεΐνες, οι G πρωτεΐνες χρησιμεύουν για την ενίσχυση ενός μικρού συναπτικού σήματος (το οποίο αντιπροσωπεύεται από τα σχετικά λίγα μόρια νευρομεταβιβαστών και υποδοχέων) σε ένα μεγάλο αριθμό ενεργοποιημένων συμπλεγμάτων κυκλάσης που είναι απαραίτητα για την κατάλυση της σύνθεσης μιας λειτουργικής συγκέντρωσης cAMP μέσα στο κύτταρο. Μεγαλύτερη ενίσχυση επιτυγχάνεται με τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης, το επόμενο βήμα στον καταρράκτη του cAMP.



Εικόνα 1 Οι διάφοροι τύποι συναπτικών υποδοχέων.

a. Ιοντοτροπικός υποδοχέας. **b.** Οι G protein-coupled receptors αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές και συνδέονται με τον ενεργοποιητή μέσω μιας G πρωτεΐνης. Σε αυτή τη οικογένεια υποδοχέων ανήκουν οι α- και β-αδρενεργικοί υποδοχείς, οι μουσκαρινικοί υποδοχείς της Ακετυλοχολίνης (ACh), οι υποδοχείς GABA_B, ορισμένοι γλουταμικοί και σεροτονεργικοί υποδοχείς, οι υποδοχείς των νευροπεπτιδίων καθώς και οι οσφρητικοί υποδοχείς και η ροδοψίνη. **c.** Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης. Η κυτταροπλασματική περιοχή ενός υποδοχέα τυροσινικής κινάσης είναι ένα ένζυμο που φωσφορυλιώνει τον εαυτό του αλλά και άλλες πρωτεΐνες σε κατάλοιπο τυροσίνης. Η φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα του επιτρέπει να συνδεθεί και επομένως να ενεργοποιήσει άλλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και άλλων κινασών που μπορούν να δράσουν σε ιοντικά κανάλια. Οι υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης ενεργοποιούνται τυπικά από ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και νευροπεπτίδια.

Εικόνα 2 G protein-coupled receptor. Απεικόνιση των 7 διαμεμβρανικών περιοχών ενός υποδοχέα που συνδέεται με μια G πρωτεΐνη



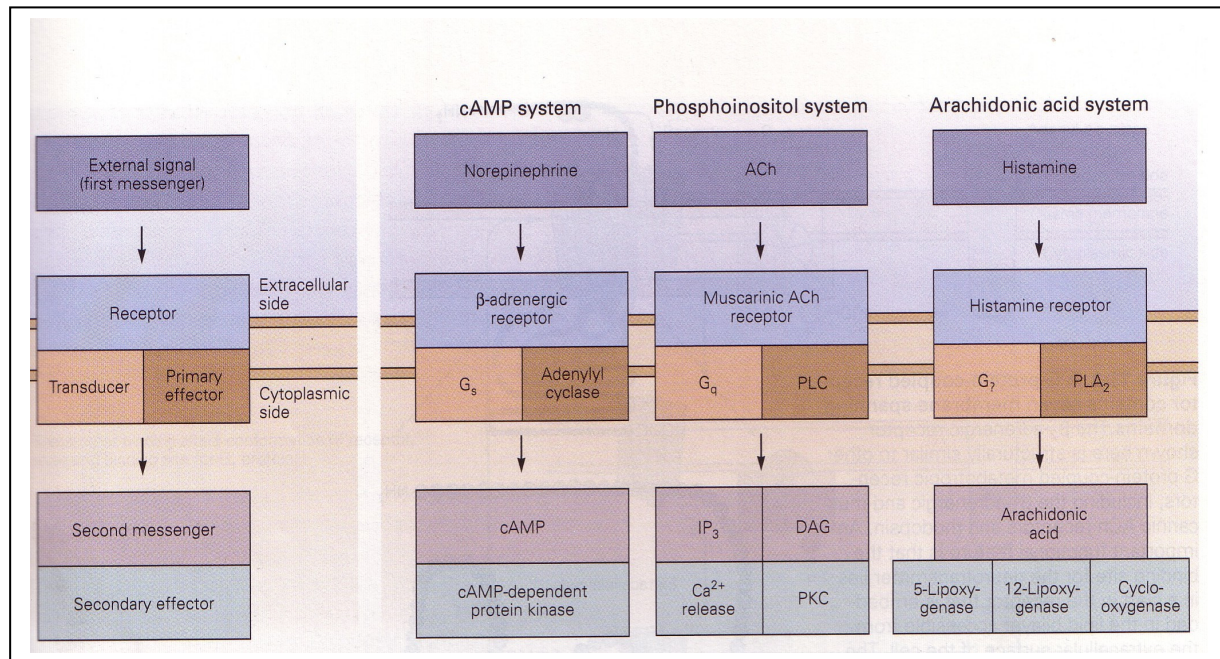
Δεύτεροι Αγγελιοφόροι

Ο αριθμός των ουσιών που αναγνωρίζονται να δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι στη συναπτική μεταβίβαση είναι πολύ μικρότερος από τον αριθμό των νευρομεταβιβαστών. Οι λίγοι δεύτεροι αγγελιοφόροι που έχουν μελετηθεί εκτενώς ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: στους μη αέριους και στους αέριους.

Στους μη αέριους δευτέρους αγγελιοφόρους ανήκει η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, διεθνώς γνωστή ως **cAMP**. Ακόμη, μια άλλη κατηγορία μη αέριων δευτέρων αγγελιοφόρων, που παράγεται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, είναι η διακυλογλυκερόλη (**DAG**), η πολυφωσφορική ινοσιτόλη (**IP₃**) και το **αραχιδονικό οξύ**. Ακόμη στους μη αέριους δευτέρους αγγελιοφόρους μπορούμε να εντάξουμε τα **Ca²⁺** και το **cGMP**.

Οι αέριοι δευτεροί αγγελιοφόροι έχουν μεγάλη ικανότητα διάχυσης. Οι πιο καλά μελετημένοι αέριοι δευτεροί αγγελιοφόροι είναι το οξειδίο του αζώτου (nitric oxide, **NO**) και το μονοξείδιο του άνθρακα (carbon monoxide, **CO**). Το ένζυμο συνθάση του οξειδίου του αζώτου παράγει NO ενώ η οξυγενάση της αίμης παράγει CO.

Παρά τις διαφορές τους, οι δευτεροί αγγελιοφόροι έχουν πολλά κοινά βασικά χαρακτηριστικά τόσο στην παραγωγή τους όσο και στον τρόπο δράσης τους (Εικ. 3).



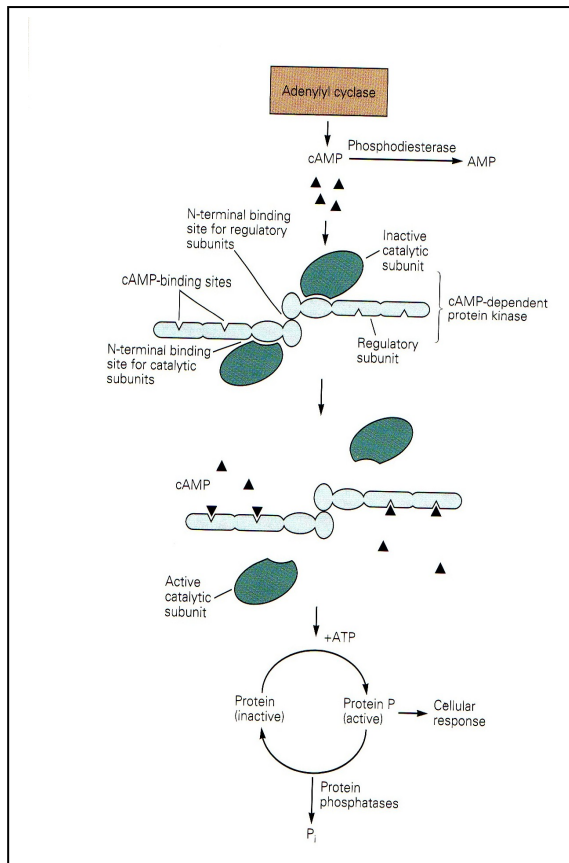
Εικόνα 3 Ο κοινός μηχανισμός δράσης των συστημάτων των δευτέρων αγγελιοφόρων. Η ενεργοποίηση του ενεργοποιητή στους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες απαιτεί τη συμμετοχή διαφόρων πρωτεϊνών. Τυπικά ο ενεργοποιητής είναι ένα ένζυμο που παράγει έναν δευτερο αγγελιοφόρο. Οι δευτεροί αυτοί αγγελιοφόροι με τη σειρά τους, πυροδοτούν ένα βιοχημικό καταρράκτη είτε μέσω ενεργοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινάσων που φωσφορυλιώνουν διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου (σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης) είτε μέσω κινητοποίησης ιόντων Ca²⁺ από τις ενδοκυττάριας αποθήκες. Με τον τρόπο αυτό ξεκινούν οι αντιδράσεις που μεταβάλλουν την βιοχημική κατάσταση του κυττάρου.

Η σύνδεση του νευρομεταβιβαστή σε έναν υποδοχέα που συνδέεται με G πρωτεΐνη ενεργοποιεί την τριμερή G πρωτεΐνη (Για τις G-πρωτεΐνες βλέπε Παράρτημα 1). Η ενεργοποιημένη G πρωτεΐνη στη συνέχεια συνδέεται με την α υπομονάδα της, σε ένα ένζυμο-ενεργοποιητή: στην αδενυλική κυκλάση στην οδό του cAMP, στη φωσφολιπάση C στην οδό της πολυφωσφορικής ινοσιτόλης και στην φωσφολιπάση A στην οδό του αραχιδονικού οξέος. Το cAMP, η πολυφωσφορική ινοσιτόλη και το αραχιδονικό οξύ αποτελούν τους δευτέρους αγγελιοφόρους. Κάθε μια από αυτές τις οδούς εγκαινιάζει αλλαγές σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους μέσα στο κύτταρο ενεργοποιώντας πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες στόχους.

Καθώς μια και μόνο πρωτεϊνική κινάση μπορεί να φωσφορυλιώσει πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες στόχους, η αλλαγή της κατάστασης μιας κινάσης μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση και διάδοση του σήματος.

Πρωτεϊνικές κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες (και οι φωσφατάσες) δρουν στα υποστρώματά τους είτε σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης (Ser/Thr κινάσες) είτε σε κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr κινάσες). Ορισμένα από αυτά τα ένζυμα είναι ειδικά μόνο για ένα ή για μικρό αριθμό πρωτεϊνικών στόχων, ενώ άλλα είναι πολύ-λειτουργικά και έχουν μεγάλο εύρος πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Η δράση των κινάσων (αλλά και των φωσφατασών) μπορεί να ρυθμιστεί είτε από τους δευτέρους αγγελιοφόρους, όπως προαναφέρθηκε, είτε από εξωκυττάρια χημικά σήματα, όπως π.χ αυξητικούς παράγοντες. *Τυπικά, οι δευτέροι αγγελιοφόροι ενεργοποιούν τις Ser/Thr κινάσες ενώ τα εξωκυττάρια σήματα ενεργοποιούν τις Tyr κινάσες.*



Πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από το cAMP (cAMP-dependent protein kinase - PKA). Ο άμεσος στόχος του cAMP είναι η Πρωτεϊνική κινάση που εξαρτώνται από το cAMP ή αλλιώς PKA. Η PKA είναι ένα τετραμερές σύμπλεγμα από δύο καταλυτικές και δύο ανασταλτικές (ρυθμιστικές) υπομονάδες (βλέπε και Παράρτημα 2). Το cAMP συνδέεται στις ρυθμιστικές υπομονάδες, προκαλώντας απελευθέρωση των καταλυτικών υπομονάδων και με τον τρόπο αυτό ενεργοποιεί την PKA. Η απομάκρυνση των ανασταλτικών υπομονάδων αποτελεί έναν γενικό μηχανισμό ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών κινάσων από τους δευτέρους αγγελιοφόρους. Οι καταλυτικές υπομονάδες της PKA φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης από πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες στόχους (Εικ. 4).

Εικόνα 4 Η ρυθμιστική δράση της PKA

Πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C – PKC). Μια άλλη σημαντική Ser/Thr κινάση είναι η Πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Οι PKC αποτελούν μονομερείς κινάσες που ενεργοποιούνται από τους δευτέρους αγγελιοφόρους DAG και Ca^{2+} . Κάθε ένζυμο περιέχει καταλυτικές και ρυθμιστικές περιοχές στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η DAG προκαλεί μετακίνηση της PKC από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη του κυττάρου όπου επίσης συνδέεται με Ca^{2+} και φωσφατιδυλσερίνη (βλέπε και Παράρτημα 2).

Παράρτημα 2- PKA

Οι ρυθμιστικές υπομονάδες της PKA, εκτός από την ανασταλτική ενζυματική δράση τους, μπορούν ακόμα να οδηγήσουν τις ρυθμιστικές υπομονάδες σε συγκεκριμένους στόχους μέσα στα κύτταρα. Μια τάξη πρωτεϊνών που καλούνται πρωτεΐνες προσκολλημένες στην Α κινάση, οι AKAPs (A kinase attachment proteins- AKAPs) συνδέονται ειδικά σε μια ισομορφή των ρυθμιστικών υπομονάδων (R_{II}) και θεωρείται ότι τοποθετούν την PKA δίπλα στα ιοντικά κανάλια.

Η ειδικότητα των πρωτεϊνικών κινασών εξαρτάται ακόμη σημαντικά από το γεγονός ότι συγκεκριμένες κινάσες μπορούν μόνο να φωσφορυλιώσουν τις πρωτεΐνες σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης που περιέχονται μέσα σε ένα κείμενο από συγκεκριμένη αλληλουχία φωσφορυλίωσης, γύρω από το κατάλοιπο που πρόκειται να φωσφορυλιωθεί. Για παράδειγμα, η PKA για να φωσφορυλιώσει απαιτεί συνήθως μια αλληλουχία φωσφορυλίωσης δύο συνεχόμενων βασικών αμινοξέων (λυσίνη ή αργινίνη), η οποία ακολουθείται από ένα οποιοδήποτε κατάλοιπο και στη συνέχεια ακολουθεί το κατάλοιπο σερίνης ή θρεονίνης: π.χ Arg-Arg-Phe-Thr

PKC

Υπάρχουν τουλάχιστον εννέα ισομορφές της PKC και όλες συναντώνται στο νευρικό ιστό. Δύο λειτουργικά ενδιαφέρουσες διαφορές έχουν βρεθεί μεταξύ των ισομορφών αυτών. Η πρώτη είναι ότι οι επονομαζόμενες μείζονες μορφές (α, β_I, β_{II} και γ) έχουν όλες μια θέση δέσμευσης του Ca²⁺ και ενεργοποιούνται από τα ιόντα Ca²⁺. Οι ελάσσονες μορφές (π.χ δ, ε, ζ) στερούνται αυτής της περιοχής και επομένως η ενεργοποίησή τους είναι ανεξάρτητη από τα ιόντα Ca²⁺. Η δεύτερη ενδιαφέρουσα διαφορά είναι ότι από τις μείζονες ισομορφές μόνο η PKCγ ενεργοποιείται από χαμηλές συγκεντρώσεις αραχιδονικού οξέος.

Όλες οι ισομορφές περιέχουν μεταξύ της καταλυτικής και ρυθμιστικής περιοχής τους μια περιοχή που είναι ευαίσθητη σε πρωτεόλυση. Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ σε συνδυασμό με παρατεταμένη δράση της PKC μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση πρωτεασών οι οποίες «κόβουν» την κινάση στην ενδιάμεση αυτή περιοχή. Προκύπτει με τον τρόπο αυτό μια μορφή της PKC που ονομάζεται PKM, η οποία είναι συνεχώς δραστική γιατί στερείται της ρυθμιστικής περιοχής. Η ισομορφή PKCζ στην οποία λείπει η ρυθμιστική περιοχή μπορεί να συντεθεί στους νευρώνες του ιππόκαμπου κατά τη διάρκεια παραγωγής του LTP. Θεωρείται ότι οι PKMs προκαλούν αλλαγές στην πλαστικότητα των συναψων οι οποίες συνδέονται με συγκεκριμένες μορφές μνήμης και μάθησης.

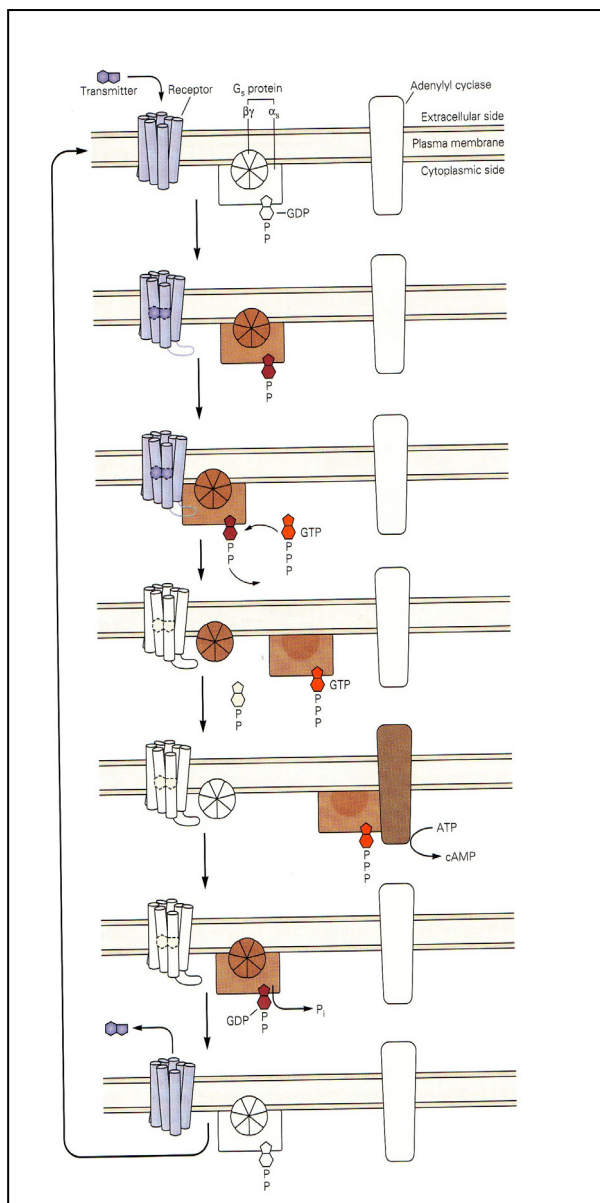
Πρωτεϊνική κινάση τύπου II που εξαρτάται από Ca²⁺/καλμοδουλίνη (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II – CaMKII). Τα ιόντα Ca²⁺ συνδέονται στη καλμοδουλίνη και ρυθμίζουν με τον τρόπο αυτό την φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Από αυτές, η πιο διαδεδομένη στους νευρώνες είναι η CaMKII, μια Ser/Thr κινάση με πολλές λειτουργίες. Η CaMKII αποτελείται από δώδεκα υπομονάδες που στον εγκέφαλο είναι τύπου α και β. Κάθε υπομονάδα περιέχει μια καταλυτική και μια ρυθμιστική περιοχή καθώς και άλλες περιοχές που επιτρέπουν στο ένζυμο να ολιγομεριστεί και να στοχεύσει στην κατάλληλη περιοχή του κυττάρου. Το Ca²⁺/καλμοδουλίνη ενεργοποιεί την CaMKII με το να απομακρύνει την ανασταλτική περιοχή από την καταλυτική πλευρά. Η CaMKII φωσφορυλιώνει ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων ιοντικών καναλιών και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος.

Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο (Mitogen-activated protein kinase – MAPK). Εκτός από τις κινάσες που ενεργοποιούνται άμεσα από δευτέρους αγγελιοφόρους μερικές κινάσες είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν από άλλα σήματα, όπως για παράδειγμα να φωσφορυλιωθούν από άλλες κινάσες. Παράδειγμα τέτοιων κινασών είναι αυτές που ενεργοποιούνται από το μιτογόνο, οι MAPKs ή ERKs (extracellular signal-regulated kinases). Οι MAPKs είναι συνήθως ανενεργές στους νευρώνες αλλά ενεργοποιούνται όταν φωσφορυλιώνονται από άλλες κινάσες. Στην πραγματικότητα οι MAPKs αποτελούν μέρος ενός καταρράκτη αντιδράσεων των κινασών όπου η μια κινάση φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την επόμενη κινάση. Τα εξωκυττάρια σήματα που πυροδοτούν αυτόν τον καταρράκτη των κινασών είναι συχνά αυξητικοί παράγοντες που συνδέονται στους υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν μονομερείς G πρωτεΐνες όπως οι ras. Μετά την ενεργοποίησή τους οι MAPKs μπορούν να φωσφορυλιώσουν μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση.

Η οδός του cAMP

Η οδός του cAMP αποτελεί ένα πρότυπο ενδοκυττάριου συστήματος μετάδοσης σήματος που χρησιμοποιεί υδατοδιαλυτό δεύτερο αγγελιοφόρο που διαχέεται μέσα στο κυτταρόπλασμα. *Η οδός αυτή καταδεικνύει τα τυπικά βήματα μιας νευρωνικής οδού δευτέρου αγγελιοφόρου.*

Η σύνδεση του νευρομεταβιβαστή στον υποδοχέα που συνδέεται με τον καταρράκτη του cAMP, οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας διεγερτικής G πρωτεΐνης που ονομάζεται G_s . Στη συνήθη, απενεργοποιημένη κατάσταση η G_s φυσιολογικά έχει συνδεδεμένο ένα μόριο GDP. Κατά την ενεργοποίησή της η G_s ανταλλάσσει το μόριο GDP με ένα μόριο GTP και έτσι μεταπίπτει στην ενεργοποιημένη της κατάσταση. Η ενεργοποιημένη G πρωτεΐνη στη συνέχεια ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Το ένζυμο αυτό, μια ενδομεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη 12 φορές,



καταλύει με τη σειρά της την μετατροπή του ATP σε cAMP. Το σύμπλεγμα GTP-G πρωτεΐνη και η καταλυτική υπομονάδα της αδενυλικής κυκλάσης μαζί, αποτελούν την ενεργή μορφή του ενζύμου.

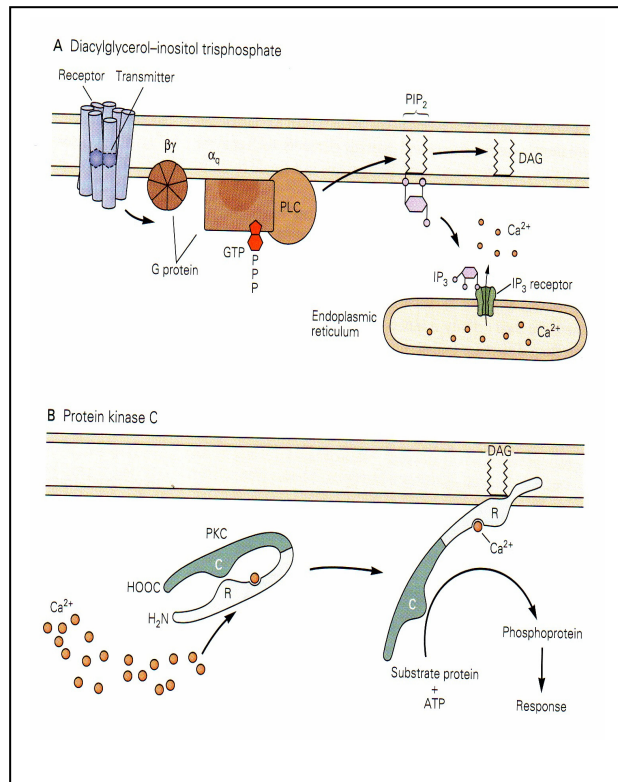
Όταν η G_s συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα της κυκλάσης, η πρώτη δρα επίσης και ως GTPάση, υδρολύοντας το συνδεδεμένο GTP σε GDP. Σαν αποτέλεσμα, η G πρωτεΐνη αποσυνδέεται από την κυκλάση και την απενεργοποιεί. Σταματάει με τον τρόπο αυτό η σύνθεση του cAMP. Η διάρκεια της σύνθεσης του cAMP ρυθμίζεται από τη δράση GTPάσης της G_s . Υπό τη συνεχή παρουσία του νευρομεταβιβαστή, μετά την υδρόλυση του GTP, η G_s έχει την ικανότητα να συνδεθεί σε ένα νέο σύμπλεγμα νευρομεταβιβαστή-υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου και με τον τρόπο αυτό να ενεργοποιηθεί και πάλι μια άλλη κυκλάση (Εικ. 5).

Εικόνα 5 Η οδός του cAMP

Ο κύριος στόχος δράσης του cAMP στα περισσότερα κύτταρα είναι η PKA. Σε απουσία του cAMP, οι ρυθμιστικές υπομονάδες συνδέονται με τις

καταλυτικές και με τον τρόπο αυτό τις αναστέλλουν. Σε παρουσία cAMP, κάθε μια από τις ρυθμιστικές υπομονάδες συνδέεται με δύο μόρια cAMP, προκαλώντας

αλλαγές της διαμόρφωσης που προκαλούν τον αποχωρισμό των καταλυτικών από τις ρυθμιστικές υπομονάδες. Οι ελεύθερες καταλυτικές υπομονάδες στη συνέχεια μεταφέρουν την γ φωσφορική ομάδα του ATP στις υδροξυλικές ομάδες συγκεκριμένων καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.



Υδρόλυση των φωσφολιπιδίων

Πολλοί σημαντικοί δευτεροί αγγελιοφόροι παράγονται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της εσωτερικής πλευράς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Εικ. 6α). Η υδρόλυση αυτή καταλύεται από δύο συγκεκριμένα ένζυμα, την Φωσφολιπάση C και την Φωσφολιπάση A₂. Κάθε ένα από αυτά μπορεί να ενεργοποιηθεί από διαφορετικές G πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με διαφορετικούς υποδοχείς. Αν και τα δύο αυτά ένζυμα μπορούν να δράσουν σε πολλά φωσφολιπίδια, το πιο συνηθισμένο φωσφολιπίδιο που υδρολύουν είναι η 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₂).

Εικόνα 6 Η Υδρόλυση των φωσφολιπιδίων.

- Υδρόλυση του PIP₂ από την PLC.
- Ενεργοποίηση της PKC από την DAG.

Η οδός της Φωσφολιπάσης C

Η δράση της Φωσφολιπάσης C στη PIP₂ οδηγεί στο σχηματισμό της διακυλογλυκερόλης (DAG) και της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃) που αποτελούν δευτέρους αγγελιοφόρους του κυττάρου.

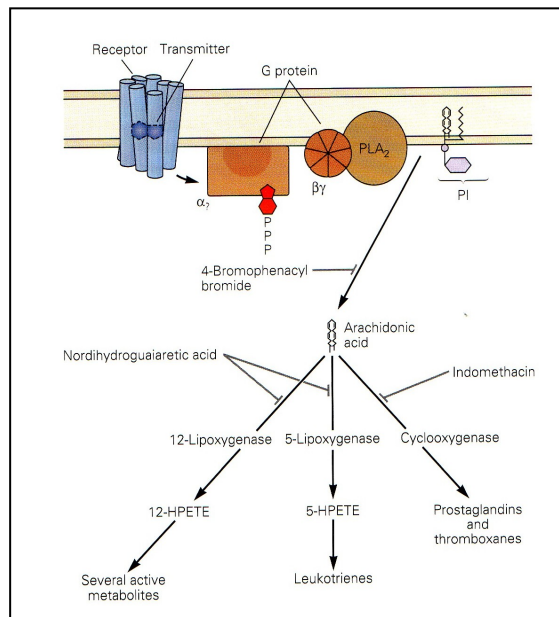
Η DAG, που είναι υδρόφοβη, παραμένει στην μεμβράνη όπου ενεργοποιεί την PKC (Εικ.6b). Στην απενεργοποιημένη της μορφή η κινάση αυτή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν παράγεται η DAG, το ένζυμο μετακινείται στην μεμβράνη για να σχηματίσει το ενεργό σύμπλεγμα που μπορεί να φωσφορυλιώσει πολλά πρωτεϊνικά υποστρώματα στο κύτταρο, τόσο στη μεμβράνη όσο και στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση της PKC απαιτεί τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και συχνά απαιτεί και αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικού Ca²⁺ εκτός από την DAG.

Η IP₃, το δεύτερο σκέλος της οδού της Φωσφολιπάσης C, οδηγεί στην απελευθέρωση Ca²⁺ από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες προς το κυτταρόπλασμα (Εικ. 6a). Η αύξηση του ενδοκυττάρειου Ca²⁺ με τη σειρά της μπορεί να πυροδοτήσει πολλές βιοχημικές αντιδράσεις καθώς και το άνοιγμα ιοντικών καναλιών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Το σημαντικό σε αυτή την οδό της Φωσφολιπάσης C είναι ότι τα δύο προϊόντα της υδρόλυσης (DAG και IP₃) μπορούν να δράσουν τόσο ανεξάρτητα όσο και σε συνδυασμό.

Η οδός της Φωσφολιπάσης A

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούν τη Φωσφολιπάση A προκαλούν την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από την κυτταρική μεμβράνη (Εικ. 7). Το αραχιδονικό οξύ με τη σειρά του μετατρέπεται ταχύτατα σε μια οικογένεια ενεργών μεταβολιτών, τα



εικοσανοειδή (περιέχουν 20 άτομα άνθρακα). Το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται από τρεις τύπους ενζύμων: α) κυκλοοξυγενάσες, που παράγουν προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες, β) διάφορες λιποοξυγενάσες, που παράγουν μια ποικιλία μεταβολιτών και γ) το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450 που οξειδώνει τόσο το αραχιδονικό οξύ όσο και τους μεταβολίτες της κυκλοοξυγενάσης και της λιποοξυγενάσης.

Εικόνα 7 Η οδός της Φωσφολιπάσης A

Το αραχιδονικό οξύ και οι μεταβολίτες του είναι λιποδιαλυτές ουσίες και διαχέονται σε μεγάλο βαθμό διαμέσου των μεμβρανών. Μπορούν να δράσουν τόσο μέσα στα κύτταρα στα οποία παράγονται όσο και σε γειτονικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου και του προσυναπτικού νευρώνα. Επομένως, αυτές οι ουσίες μπορούν να δράσουν σαν διακυτταρικοί συναπτικοί αγγελιοφόροι.

Η οδός της Τυροσινικής κινάσης

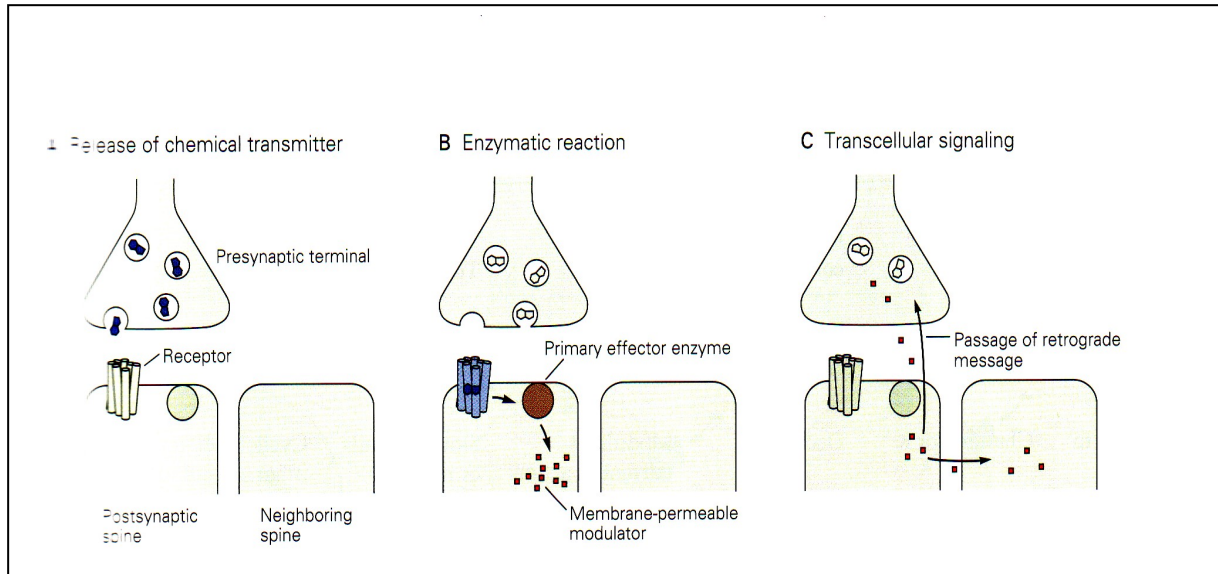
Όπως και οι υπόλοιπες κινάσες, η τυροσινική κινάση μέσω της φωσφορυλίωσης των νευρωνικών πρωτεϊνών ρυθμίζει τη λειτουργία τους. Τα υποστρώματα της τυροσινικής κινάσης συχνά ανήκουν σε μια συγκεκριμένη τάξη πρωτεϊνών που θεωρείται ότι προκαλούν μακροχρόνιες αλλαγές στη νευρωνική λειτουργία.

Η πιο καλά χαρακτηρισμένη δράση του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης είναι η έναρξη ενός καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγούν τελικά σε αλλαγές στην μεταγραφή των γονιδίων.

Οι αέριοι δεύτεροι αγγελιοφόροι: Οξειδίο του Αζώτου (NO) και Μονοξειδίο του Άνθρακα (CO)

Το NO παράγεται στους νευρώνες από το ένζυμο συνθάση του NO (NO synthase), που είναι ένα Ca^{2+} /καλμοδουλίνη-εξαρτούμενο ένζυμο, σαν απάντηση στο γλουταμικό το οποίο δρα μέσω των NMDA υποδοχέων και απαιτεί ένα ρεύμα ιόντων Ca^{2+} . Το CO παράγεται από το ένζυμο οξυγενάση της αίμης (heme oxygenase).

Το NO και το CO έχουν τρεις χαρακτηριστικές ιδιότητες: 1) Διαπερνούν εύκολα τις μεμβράνες, 2) επηρεάζουν γειτονικά κύτταρα χωρίς να δρουν μέσω επιφανειακών υποδοχέων και 3) έχουν πολύ μικρό χρόνο ζωής. Έτσι, οι ουσίες αυτές μπορούν να λειτουργούν ως διακυτταρικοί (ανάδρομοι) αγγελιοφόροι (Εικ. 8). Και οι δύο αυτοί αέριοι αγγελιοφόροι ασκούν τη δράση τους μέσω της διέγερσης της σύνθεσης του cGMP.



Εικόνα 8 Αέριοι δεύτεροι αγγελιοφόροι. a. Ο υποδοχέας ενεργοποιεί ένα ένζυμο. b. Το ένζυμο παράγει έναν μετατροπέα που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, π.χ. NO. c. Το NO μπορεί να περάσει στο γειτονικό μετασυναπτικό νευρώνα καθώς και στο προσυναπτικό άκρο όπου μπορεί να δράσει ως δεύτερος αγγελιοφόρος. Ο διακυτταρικός δεύτερος αγγελιοφόρος του προσυναπτικού άκρου καλείται πλέον ανάδρομος αγγελιοφόρος (retrograde messenger).

Τα είδη της μνήμης

Η μνήμη θα μπορούσε να οριστεί ως η διαδικασία κατά την οποία η γνώση κωδικοποιείται, αποθηκεύεται και στη συνέχεια ανακαλείται. Η αποθήκευση της μνήμης δεν γίνεται σε ένα συγκεκριμένο τμήμα ή περιοχή του εγκεφάλου. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι μνήμης και για κάθε τύπο διαφορετική περιοχή του εγκεφάλου είναι σημαντική για την αποθήκευσή της.

Αδρά θα μπορούσαμε να ταξινομήσουμε τη μνήμη σε Πρόσφατη Μνήμη (Short-term memory) και Μακροχρόνια Μνήμη (Long-term memory).

Short-term memory

Η έννοια Short-term memory δηλώνει ένα χρονικά περιορισμένο σύστημα μνήμης όπου τα μνημονικά στοιχεία χάνονται αυθόρμητα μέσα σε δευτερόλεπτα, δηλαδή έχει περιορισμένη χωρητικότητα. Ειδική μορφή και επέκταση της Short-term memory αποτελεί η Working Memory η οποία διαφέρει στα εξής: 1) θεωρείται ότι εμπεριέχει έναν αριθμό υποσυστημάτων και 2) δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στο λειτουργικό της ρόλο σε άλλες νοητικές διεργασίες (όπως μάθηση, διαλογισμός, κατανόηση) αλλά και στη Long-term memory όπως θα δούμε παρακάτω.

Τρία είναι τα υποσυστήματα που θεωρείται ότι συνθέτουν τ Working Memory. Ένα σύστημα ελέγχου της προσοχής (ή κεντρικό εκτελεστικό-central executive) το οποίο επικεντρώνει την προσοχή σε συγκεκριμένα γεγονότα στο περιβάλλον. Θεωρείται ότι βρίσκεται στον προμετωπιαίο λοβό και έχει περιορισμένη χωρητικότητα.

Το σύστημα ελέγχου της προσοχής ρυθμίζει τη ροή των πληροφοριών προς δύο επαναληπτικά συστήματα που θεωρείται ότι διατηρούν την μνήμη για προσωρινή

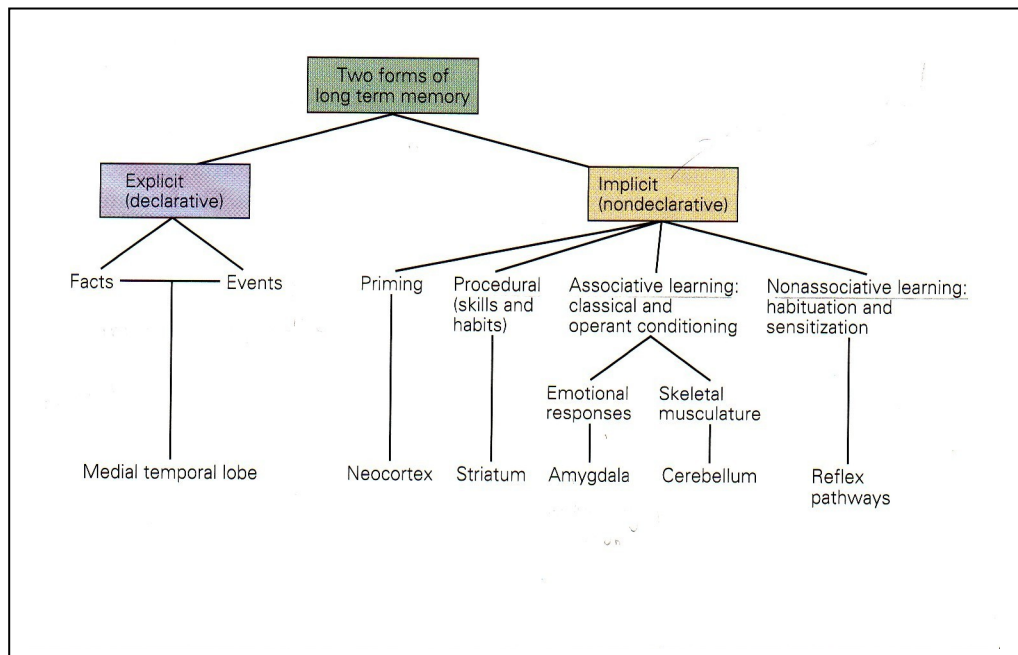
χρήση: το articulatory loop για τη γλώσσα και το visuospatial sketch pad για τις εικόνες και τη δράση.

Οι πληροφορίες που επεξεργάζονται σε κάθε ένα από αυτά τα επαναληπτικά συστήματα Working Memory έχουν την ικανότητα να μετατρέπονται σε Long-term memory. Τα δύο επαναληπτικά συστήματα πιστεύεται ότι βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές του οπίσθιου συνειρμικού φλοιού (posterior association cortices).

Long-term memory

Η Long-term memory μπορεί να διακριθεί σε implicit memory (ή nondeclarative memory-μη δηλωτική μνήμη) και σε explicit memory (ή declarative memory-δηλωτική μνήμη) (Εικ. 9).

Εικόνα 9
Ταξινόμηση της Long-term memory
(βλέπε κείμενο).



A. Implicit Memory

Η implicit memory αναφέρεται σε πληροφορίες σχετικά με το πώς γίνεται κάτι, μια μνήμη που ανακαλείται ασυνείδητα. Είναι αρκετά άκαμπτη και στενά συνδεδεμένη με το αρχικό ερέθισμα που προκάλεσε τη μάθηση. Η implicit memory τυπικά εμπλέκεται με εκμάθηση αντανακλαστικών κινήσεων ή αντιληπτικών δεξιοτήτων. Η μνήμη αυτή αποκτάται αργά, με πολλαπλή επανάληψη και εκφράζεται κυρίως με πράξεις παρά με λόγο. Διαφορετικοί τύποι της implicit memory αποκτούνται μέσα από διαφορετικές διαδικασίες μάθησης και αποθηκεύονται σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Πειραματικά δεδομένα χωρίζουν την implicit memory σε μη σχετιζόμενη (nonassociative memory) και σε σχετιζόμενη μνήμη (associative memory).

Στην nonassociative memory το υποκείμενο μαθαίνει τις ιδιότητες ενός ερεθίσματος και στην καθημερινή ζωή δύο τύποι αυτής είναι συχνοί:

το Habituation (μείωση της απάντησης όταν το ερέθισμα επαναλαμβάνεται συνεχώς και το Sensitization (αυξημένη αντίδραση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων μετά από την εφαρμογή ενός επώδυνου ερεθίσματος).

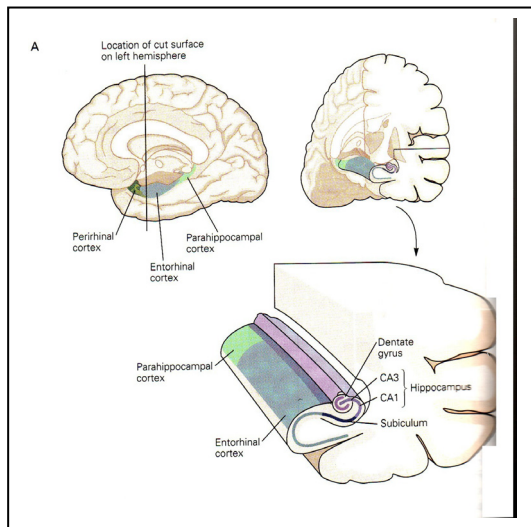
Στην associative memory το υποκείμενο μαθαίνει τη σχέση μεταξύ δύο ερεθισμάτων ή μεταξύ ενός ερεθίσματος και μιας συμπεριφοράς. Και εδώ διακρίνονται δύο τύποι: Classical conditioning (μάθησης της σχέσης μεταξύ δύο ερεθισμάτων) και Operant

conditioning (μάθηση της σχέσης μεταξύ μιας συμπεριφοράς και των αποτελεσμάτων αυτής).

B. Explicit Memory

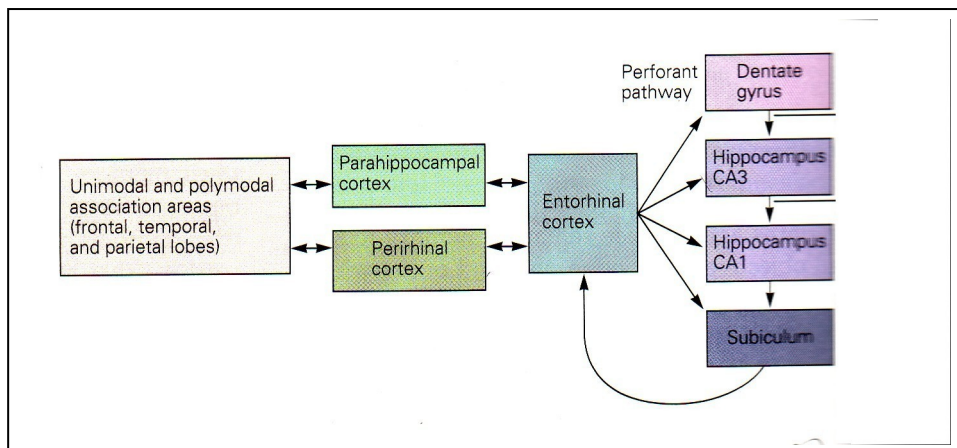
Η explicit memory αναφέρεται σε πραγματική γνώση ανθρώπων, χώρου και πραγμάτων και στο τι τα γεγονότα αυτά σημαίνουν. Ανακαλείται με εσκεμμένη, συνειδητή, προσπάθεια. Η explicit memory είναι πάρα πολύ ευέλικτη και εμπεριέχει το συνδυασμό πολλαπλών στοιχείων και πληροφοριών. Η explicit memory μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε episodic (μια μνήμη για γεγονότα και προσωπικές εμπειρίες) και σε semantic (μια μνήμη για δεδομένα).

Η explicit memory περιλαμβάνει μια ειδική ανατομική περιοχή στο μέσο κροταφικό λοβό καθώς και έναν σχηματισμό στο βάθος αυτού, τον ιππόκαμπο. (Εικ. 10)



Εικόνα 10 Ανατομία της explicit memory. Ο ιππόκαμπος και οι λοιπές περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην explicit memory

Αναλυτικότερα, η γνώση που αποθηκεύεται ως explicit memory αρχικώς σχηματίζεται μέσω διαδικασιών σε μία ή περισσότερες από τις τρεις πολυδύναμες συνειρμικές φλοιϊκές περιοχές (προμετωπιαίο, μεταιχμιακό και βρεγματο-ινιακο-κροταφικό φλοιό) όπου συνθέτονται οπτικές, ακουστικές και σωματικές πληροφορίες. Στη συνέχεια η πληροφορία μεταβιβάζεται στον ενδορρινικό φλοιό. Από εκεί διανέμεται η πληροφορία σε διάφορες φλοιϊκές περιοχές, όπου ανάλογα με το είδος της πληροφορίας γίνεται η επεξεργασία της, για να επιστρέψει και πάλι πίσω στον ενδορρινικό φλοιό. Τελικά η πληροφορία καταλήγει εκεί όπου αρχικά δημιουργήθηκε, στις πολυδύναμες συνειρμικές περιοχές του νεοφλοιού όπου και αποθηκεύεται (Εικ. 11).



Εικόνα 11 Οι οδοί εισόδου και εξόδου της πληροφορίας στον ιππόκαμπο.

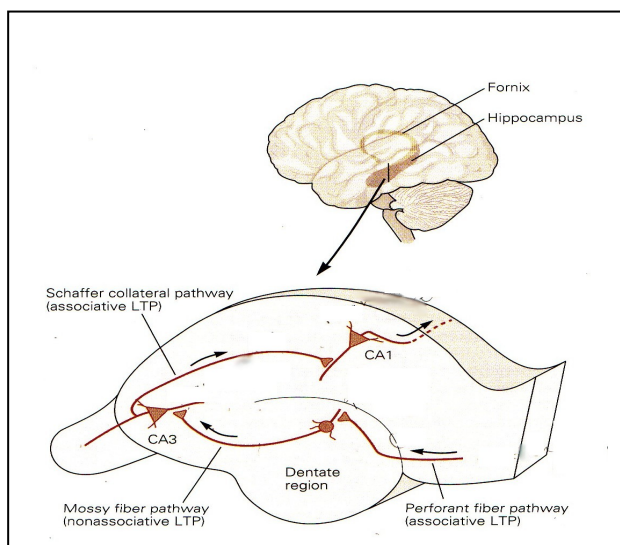
Μπορούμε εν κατακλείδι να πούμε ότι δεν υπάρχει μια μόνο μνήμη ούτε ένα συγκεκριμένο μέρος του εγκεφάλου που να λειτουργεί ως αποθήκη μνήμης. Κάθε κομμάτι πληροφορίας/ γνώσης έχει πολλαπλές αντιπροσωπεύσεις στον εγκέφαλο, κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί σε διαφορετική έννοια και μπορεί να προσεγγιστεί ανεξάρτητα (από οπτικά, λεκτικά ή αισθητικά ερεθίσματα). Η explicit memory, όπως και η implicit, έχει μια short term φάση που δεν απαιτεί πρωτεϊνοσύνθεση και μια long term φάση που απαιτεί τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών και αυτό αναπαριστάται και στο μοριακό επίπεδο, όπως θα δούμε παρακάτω.

Τόσο η episodic memory όσο και η semantic memory είναι το αποτέλεσμα τουλάχιστον τεσσάρων σχετιζόμενων αλλά ανεξάρτητων διαδικασιών:

της **κωδικοποίησης (encoding)** που αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία οι πρόσφατες πληροφορίες επεξεργάζονται. Για να επιμείνει μια μνήμη θα πρέπει να γίνει σωστή κωδικοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με το να συνδυάζεται νοηματικά και συστηματικά η πληροφορία με γνώσεις που είναι ήδη ισχυρά εδραιωμένες, του **συσχετισμού (consolidation)** που αναφέρεται στη διαδικασία εκείνη κατά την οποία οι προσφάτως αποθηκευμένες και ακόμη ευαίσθητες πληροφορίες, αλλάζουν για να γίνουν πιο σταθερές στην μακροχρόνια αποθήκευση. Εμπλέκει την έκφραση γονιδίων και τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών, της **αποθήκευσης (storage)** που αναφέρεται στο μηχανισμό και στις θέσεις που κρατείται η μνήμη μέσα στο χρόνο και της **ανάκλησης (retrieval)** που αναφέρεται στη διαδικασία ανάκλησης και χρήσης των αποθηκευμένων πληροφοριών.

Ιππόκαμπος και Long-term potentiation

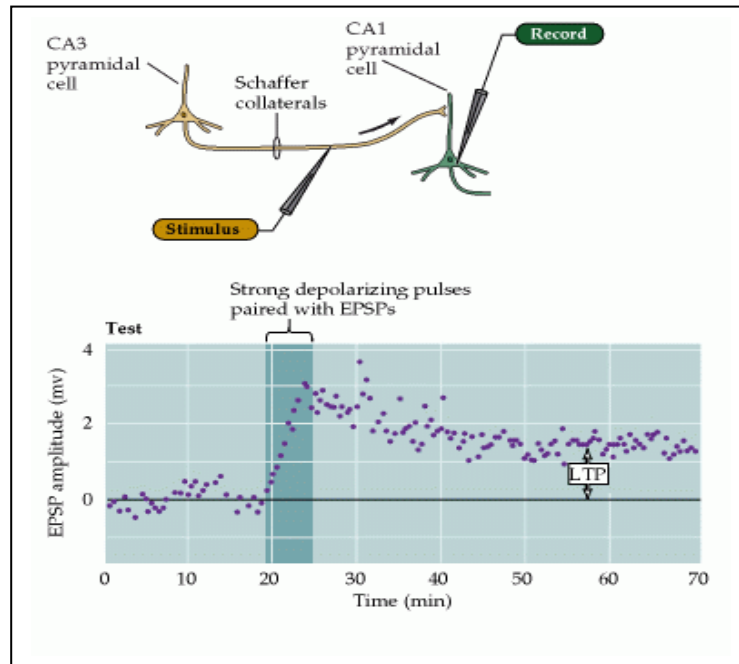
Στα θηλαστικά ένας σημαντικός παράγοντας για την αποθήκευση της explicit memory είναι ο ιππόκαμπος. Στους ανθρώπους η λειτουργική απεικόνιση του εγκεφάλου δείχνει ότι ο ιππόκαμπος ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων μνημονικών διαδικασιών και ότι βλάβη του ιππόκαμπου έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού συγκεκριμένων τύπων νέας μνήμης. Αν και πολλές άλλες περιοχές του εγκεφάλου εμπλέκονται στις πολύπλοκες διαδικασίες του σχηματισμού, αποθήκευσης και ανάκλησης της μνήμης, οι παρατηρήσεις έχουν στρέψει σήμερα την έρευνα στον συγκεκριμένο αυτό τύπο συναπτικής πλαστικότητας του ιππόκαμπου.



Εικόνα 12 Οι τρεις κύριες οδοί του ιππόκαμπου που εμπλέκονται στην αποθήκευση της μνήμης (βλέπε κείμενο).

Όπως αποδείχθηκε στον ιππόκαμπο υπάρχουν τρεις οδοί:

- 1) *perforant pathway* το οποίο προβάλλει από τον ενδορρινικό φλοιό στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας
- 2) *mossy fiber pathway* το οποίο περιλαμβάνει τους νευράξονες των κοκκωδών κυττάρων οι οποίοι προβάλλουν στα πυραμοειδή κύτταρα της CA3 περιοχής του ιππόκαμπου και
- 3) *Schaffer collateral pathway* το οποίο αποτελείται από τις διεγερτικές ίνες των πυραμοειδών κυττάρων της CA3 περιοχής και καταλήγει στα πυραμοειδή κύτταρα της CA1 περιοχής (Εικ. 12).



Εικ. 13 LTP. Αύξηση του εύρους των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών μετά από μια σειρά ερεθισμάτων υψηλής συχνότητας και παραγωγή του LTP.

Το 1973 οι Timothy Bliss και Terje Lomo ανακάλυψαν ότι *μια σύντομη, υψηλής συχνότητας σειρά ερεθισμάτων (tetanus), σε οποιοδήποτε από αυτές τις τρεις συναπτικές οδούς, αυξάνει το εύρος των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (excitatory postsynaptic potentials-EPSPs) στους νευρώνες-στόχους του ιππόκαμπου (Εικ. 13) προκαλώντας μεταβολές της συναπτικής πλαστικότητας. Η διευκόλυνση αυτή της νευρωνικής μεταβίβασης ονομάζεται **long-term potentiation (LTP)**.*

Όπως συμβαίνει με την αποθήκευση της μνήμης, και το LTP έχει φάσεις. Ένα μεμονωμένο ερέθισμα παράγει ένα βραχυχρόνιο LTP, που ονομάζεται πρώιμο LTP (early LTP), διαρκεί 1-3 ώρες και δεν απαιτεί τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών.

Τέσσερα ή περισσότερα ερεθίσματα προκαλούν μια πιο επίμονη φάση του LTP, που ονομάζεται όψιμο LTP (late LTP), διαρκεί τουλάχιστον 24 ώρες και απαιτεί τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί που παράγουν το early LTP δεν είναι οι ίδιοι στις τρεις οδούς, ενώ οι μηχανισμοί του late LTP φαίνεται να είναι οι ίδιοι (βλέπε και παράρτημα 3).

Παράρτημα 3-Οι ιδιότητες του LTP στην οδό του Schaffer collateral

Ιδιαίτερα το LTP στην οδό του Schaffer collateral έχει συγκεκριμένες ιδιότητες που το καθιστούν έναν ελκυστικό νευρωνικό μηχανισμό για τη μελέτη της διαδικασίας αποθήκευσης της μνήμης. Πρώτων, για την πρόκληση του LTP στην οδό του Schaffer collateral απαιτείται ενεργοποίηση πολλών μαζί αξόνων που κατευθύνονται προς τη CA1 περιοχή, ένα χαρακτηριστικό που καλείται cooperativity (συνεργικότητα). Δεύτερον, στην οδό αυτή απαιτείται ταυτόχρονη πυροδότηση τόσο του προσυναπτικού όσο και του μετασυναπτικού νευρώνα για να επιτευχθεί επαρκής αποπόλωση (depolarization) του μετασυναπτικού νευρώνα. Εάν ένα μόνο ερέθισμα στην οδό του Schaffer collateral, που φυσιολογικά δεν θα προκαλούσε την έκλυση LTP, συνδυάζεται με ισχυρή αποπόλωση του μετασυναπτικού CA1 κυττάρου μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα της τάξης των 100ms, το μέγεθος του EPSP αυξάνεται και παράγεται το LTP. Το τελευταίο χαρακτηριστικό συνάδει με τον κανόνα του Hebb που διατυπώθηκε το 1949 και σύμφωνα με τον οποίο: «Όταν ο άξονας ενός κυττάρου A...διεγείρει ένα κύτταρο B και επανειλημμένως ή συνεχώς παίρνει μέρος στην ενεργοποίησή του, μια αυξητική διεργασία ή μια μεταβολική αλλαγή λαμβάνει χώρα στο ένα ή και στα δύο κύτταρα ώστε η ικανότητα του A κυττάρου να διεγείρει το B κύτταρο να αυξάνεται». Τέλος, το LTP έχει την ικανότητα της ειδικότητας του εισερχόμενου ερεθίσματος: Όταν το LTP παράγεται από τη διέγερση μιας σύναψης, δεν εμφανίζεται σε άλλες ανενεργές συνάψεις που είναι σε επαφή με τον ίδιο νευρώνα. Μπορούμε λοιπόν να πούμε ότι το LTP ενεργοποιεί αυστηρά συνάψεις παρά κύτταρα. Το χαρακτηριστικό αυτό του LTP είναι σύμφωνο με τη συμμετοχή του στο σχηματισμό της μνήμης. Εάν η διέγερση μιας σύναψης οδηγούσε στη μεταβολή του δυναμικού και άλλων απενεργοποιημένων συνάψεων, θα ήταν δύσκολο να αυξηθεί επιλεκτικά το συναπτικό δυναμικό συγκεκριμένων συνάψεων, όπως αυτό απαιτείται για το σχηματισμό της μνήμης.

Η μοριακή βάση της μνήμης - συστήματα δευτέρων αγγελιοφόρων

Οι μοριακοί μηχανισμοί της μνήμης αποδείχθηκε ότι διατηρούνται στην πορεία της εξέλιξης και ότι ακόμη και οι πιο πολύπλοκες μορφές μνήμης και μάθησης εξαρτώνται από μηχανισμούς που συναντάμε στις απλές μορφές. Οι μηχανισμοί αυτοί συμβάλλουν στην ατομικότητα με το να μεταβάλλουν τις νευρικές συνάψεις στον εγκέφαλό μας.

Σε κάθε είδος μνήμης εμπλέκονται διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί, με τα συστήματα των δευτέρων αγγελιοφόρων να παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο. Έχει πλέον αποδειχθεί ότι στη διαδικασία της μνήμης εμπλέκονται διάφορα συστήματα νευρομεταβιβαστών τα οποία λειτουργούν μέσω της ενεργοποίησης συστημάτων δευτέρων αγγελιοφόρων με τελικό στόχο την πλαστικότητα των συνάψεων. Τα πιο καλά μελετημένα συστήματα νευρομεταβιβαστών είναι αυτά της σεροτονίνης και του γλουταμικού οξέος, με τα οποία και θα ασχοληθούμε.

Στη συνέχεια θα παρουσιάσουμε αναλυτικά τα τελευταία ερευνητικά δεδομένα που προκύπτουν για τους μοριακούς μηχανισμούς- και ιδιαίτερα για τα συστήματα των δευτέρων αγγελιοφόρων- που χαρακτηρίζουν κάθε ένα από τα προαναφερόμενα μοντέλα μνήμης σε διάφορους υπό μελέτη οργανισμούς.

Μέθοδοι μελέτης της μνήμης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών της μνήμης είναι ποικίλοι. Το φυλογενετικό εύρος των οργανισμών που χρησιμοποιούνται είναι μεγάλο και περιλαμβάνει ασπόνδυλα, όπως το γιγάντιο καλαμάρι *Arlysia*, αλλά και θηλαστικά, κυρίως επίμυες. Συμπεριφορικές μελέτες, μοριακές τεχνικές, διαγονιδιακοί οργανισμοί αλλά και συνδυασμός όλων των παραπάνω είναι τα όπλα της σύγχρονης επιστήμης για τη μελέτη των μνημονικών μηχανισμών.

Στην παρούσα μελέτη θα περιγράψουμε ενδεικτικά χαρακτηριστικές ερευνητικές προσεγγίσεις, καθώς ο όγκος των δεδομένων είναι απαγορευτικός για μία προς μία παρουσίαση των τεχνικών.

Εφαρμογή της τεχνικής του Morris Water Maze

Η κεντρική χορήγηση γαλανίνης εμποδίζει τη δημιουργία χωρικής μνήμης

Η Γαλανίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο που αναστέλλει την απελευθέρωση διαφόρων νευρομεταβιβαστών, όπως της σεροτονίνης, του γλουταμικού οξέος, της νοραδρεναλίνης και της ακετυλοχολίνης. Αναστέλλει επίσης την ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων δευτέρων αγγελιοφόρων, όπως τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης και την υδρόλυση της φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₂) και παράγει μνημονικά ελλείμματα. Για τους λόγους αυτούς η γαλανίνη χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της συμμετοχής των νευρομεταβιβαστών αυτών καθώς και της εμπλοκής του cAMP στη διαδικασία της μνήμης. Με τα παρακάτω πειράματα ερευνάται ποια ακριβώς φάση της μνήμης αναστέλλει η γαλανίνη στο Morris Water maze καθώς και ποιοι μηχανισμοί εμπλέκονται.

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων αξιολογείται η δράση της γαλανίνης στις διαδικασίες του encoding, consolidation και storage/retrieval. Η γαλανίνη χορηγήθηκε σε Sprague-Dawley rats σε διαφορετικές χρονικές στιγμές πριν και μετά τη δοκιμασία στη Morris Water maze σε κάθε μέρα της δοκιμασίας. Οι χρονικές στιγμές επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενα πειραματικά δεδομένα (Abel & Kandel, 1998, Izquierdo & McGaugh, 2000, Nader, Schafe, & LeDoux, 2000). Για τον έλεγχο του encoding τα χρονικές στιγμές χορήγησης της γαλανίνης ήταν 5 λεπτά πριν τη δοκιμασία και 1 λεπτό μετά. Για τον έλεγχο του consolidation οι χρονικές στιγμές ήταν 30 λεπτά και 3 ώρες μετά τη δοκιμασία. Η χρονική στιγμή που επιλέχθηκε ως ευαίσθητη για το storage/retrieval ήταν 18 ώρες μετά τη δοκιμασία. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της γαλανίνης in vivo είναι περίπου 100 λεπτά (Land, Langel, & Bartfai, 1991), αρκετά μεγάλος για την ολοκλήρωση της δοκιμασίας Morris Water maze και αρκετά μικρός για να αποφευχθούν επιπλοκές από τη δράση του φαρμάκου μεταξύ των χρονικών στιγμών και της μέρας της δοκιμασίας (McDonald & Crawley, 1997).

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων ελέγχεται ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η γαλανίνη επηρεάζει το consolidation. Είναι γνωστό ότι η γαλανίνη αναστέλλει τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης στον εγκέφαλο των επίμυων (Chen, Laburthe, & Amiranoff, 1992, Iismaa & Shine, 1999, Karelson & Langel, 1998, McDermott & Sharp, 1995, Valkna et al., 1995). Εάν η γαλανίνη επηρεάζει το consolidation μέσω της μείωσης της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης, τότε ένας μη-εκλεκτικός ενεργοποιητής της αδενυλικής κυκλάσης, όπως η forskolin (Joost, Habberfield, Simpson, Laurenza, & Seamon, 1988; Mons & Cooper, 1995) θα πρέπει να αυξάνει τα επίπεδα του cAMP και μάλιστα σε τέτοιο επίπεδο που να ανταγωνίζεται τη δράση της γαλανίνης στη δοκιμασία του Morris Water maze. Ένα ανενεργές ανάλογο της forskolin, η di-deoxyforskolin χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control.

Ζώα

Χρησιμοποιήθηκαν 183 Sprague-Dawley αρσενικοί επίμυες, με βάρος 250-350 gr κατά τη στιγμή του πειράματος, σε κατάλληλες συνθήκες διαβίωσης (θερμοκρασία: 22±1° C, 12:12 κύκλο ημέρας/νύχτας, ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή-νερό).

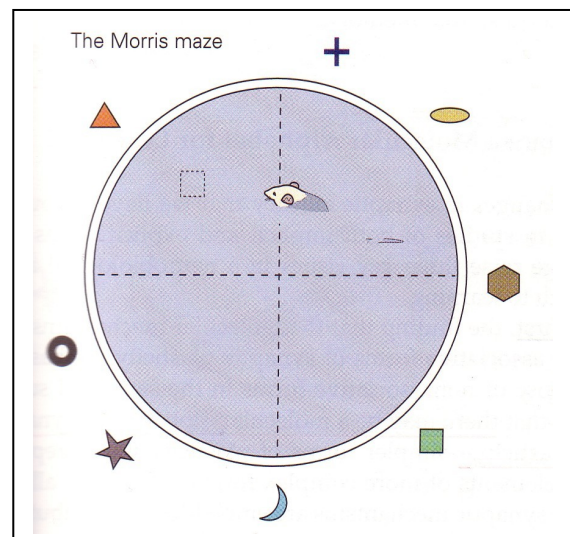
Τοποθέτηση κάνουλας

Όλα τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ξυλαζίνη (10 mg/kg)-κεταμίνη (100 mg/kg) και μια κάνουλα από ατσάλι μήκους 1,4 cm και διαμέτρου 24 gauge τοποθετήθηκε στην αριστερή πλάγια κοιλία σε συντεταγμένες 0,5 mm οπίσθια, 1,0 mm πλαγίως του βρέγματος και 3,5mm κοιλιακά της επιφάνειας του κρανίου (Paxinos & Watson, 1986). Η κάνουλα στερεοποιήθηκε με ατσάλινες βίδες και οδοντιατρικό ακρυλικό. Η κάνουλα έκλεισε και στα ζώα χορηγήθηκαν αναλγητικά (Κετοπροφένη 5 mg/kg). Μετά την επέμβαση τα ζώα παρέμειναν να αναρρώσουν σε ξεχωριστά κλουβιά για τουλάχιστον 8 ημέρες πριν την έναρξη των πειραμάτων .

Δοκιμασία Morris Water

Η δοκιμασία του Morris Water πραγματοποιήθηκε σε μια κυκλική δεξαμενή με διάμετρο 1,4 m και ύψος 0,6 m. Το νερό έφτανε τα 48 cm, σε θερμοκρασία 25 ° C και έγινε αδιάφανο με την προσθήκη μιας λευκής-μη τοξικής βαφής. Η πλατφόρμα διαφυγής, επιφάνειας 10 cm² , τοποθετήθηκε στο κέντρο ενός από τα τέσσερα τεταρτημόρια της δεξαμενής σε απόσταση 40 cm από το τοίχωμα και 1 cm κάτω από την επιφάνεια του νερού. Ένας κύβος, όγκου 10 cm³, τοποθετήθηκε στο σημείο της πλατφόρμας, ως οπτικό σημείο, σε ύψος 19 cm πάνω από την επιφάνεια του νερού (Εικ. 14). Η όλη διάταξη ήταν υπό ηλεκτρονική εποπτεία και μαγνητοσκόπηση.

Εικόνα 14 Morris Water Maze. Η πλατφόρμα είναι κρυμμένη σε ένα τεταρτημόριο ενώ στον περιβάλλοντα χώρο υπάρχουν σημεία αναγνώρισης (spatial cues)



Χορήγηση φαρμάκων

Η γαλανίνη διαλύθηκε σε φυσιολογικό ορό σε συγκέντρωση 3 nmol/3μl. Η forskolin και το ανενεργές ανάλογο της διαλύθηκαν σε DMSO+φυσιολογικό ορό σε συγκεντρώσεις 240 μmol/3μl και 242 μmol/3μl αντιστοίχως. Στα vehicle χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος φυσιολογικός ορός. Τα φάρμακα χορηγήθηκαν με μικροενέσεις στα ζώα με τη χρήση ειδικής διάταξης που προσαρμόστηκε στην κάνουλα που είχε προηγουμένως τοποθετηθεί. Η έγχυση των 3 μl του φαρμάκου έγινε σε 1.5 λεπτά, με μεσοδιάστημα 10 δευτερολέπτων μεταξύ κάθε 1 μl, και επιπρόσθετη καθυστέρηση 1 λεπτού πριν την αφαίρεση της συσκευής χορήγησης.

1^ο Πείραμα

Η γαλανίνη ή ο ορός χορηγήθηκαν πριν ή μετά από τις δοκιμασίες εκπαίδευσης κάθε μέρα σε ένα από τα πέντε χρονικά σημεία: Α. 5 λεπτά πριν την τοποθέτηση στην πισίνα, Β. 1 λεπτό μετά την απόσυρση από την πισίνα, Γ. 30 λεπτά μετά την

απόσυρση από την πισίνα, Δ. 3 ώρες μετά την απόσυρση από την πισίνα, Ε. 18 ώρες μετά την απόσυρση από την πισίνα. Για κάθε χρονικό σημείο χρησιμοποιήθηκαν 11 ζώα ως vehicle και σε 11 ζώα χορηγήθηκε η γαλανίνη. Κάθε ζώο χρησιμοποιήθηκε μόνο για ένα χρονικό σημείο και για ένα είδος χορηγούμενης ουσίας (γαλανίνη ή φυσιολογικό ορό). Στα ζώα όλων των ομάδων χορηγήθηκε γαλανίνη ή ορός για 5 διαδοχικές ημέρες (Πίνακας 1).

2^ο Πείραμα

Η forskolin και η di-deoxyforskolin χορηγήθηκαν σε δύο ομάδες ζώων. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από ζώα που έλαβαν Α. μόνο ορό (vehicle), Β. μόνο forskolin, Γ. μόνο di-deoxyforskolin 15 λεπτά πριν τοποθετηθούν στην πισίνα. Στη δεύτερη ομάδα των ζώων χορηγήθηκαν Α. 3% DMSO vehicle (15 λεπτά πριν την τοποθέτηση στην πισίνα)+ορό (30 λεπτά μετά την απόσυρση από την πισίνα), Β. 3% DMSO vehicle (15 λεπτά πριν την τοποθέτηση στην πισίνα)+γαλανίνη (30 λεπτά μετά την απόσυρση από την πισίνα), Γ. di-deoxyforskolin (15 λεπτά πριν την τοποθέτηση στην πισίνα)+γαλανίνη (30 λεπτά μετά την απόσυρση από την πισίνα), Δ. forskolin (15 λεπτά πριν την τοποθέτηση στην πισίνα)+γαλανίνη (30 λεπτά μετά την απόσυρση από την πισίνα).

Πίνακας 1. Οι χρονικές στιγμές χορήγησης γαλανίνης και ορού

Ομάδα (11 ζώα)	Γαλανίνη	Φάση μνήμης	Vehicle (φυσιολογικός ορός)
Ομάδα Α	5min πριν την τοποθέτηση στην πισίνα	encoding	5min πριν την τοποθέτηση στην πισίνα
Ομάδα Β	1min μετά την απόσυρση από την πισίνα	encoding	1min μετά την απόσυρση από την πισίνα
Ομάδα Γ	30min μετά την απόσυρση από την πισίνα	consolidation	30min μετά την απόσυρση από την πισίνα
Ομάδα Δ	3h μετά την απόσυρση από την πισίνα	consolidation	3h μετά την απόσυρση από την πισίνα
Ομάδα Ε	18h μετά την απόσυρση από την πισίνα	Storage/retri eval	18h μετά την απόσυρση από την πισίνα

Συμπεριφορική δοκιμασία

Τα ζώα μεταφέρονται ένα κάθε φορά στο δωμάτιο με τη δεξαμενή, στους εσωτερικούς τοίχους του οποίου υπάρχουν μεγάλα γεωμετρικά σχήματα που λειτουργούν ως χωρικά σημεία αναγνώρισης (spatial cues). Η εκπαίδευση για την ανεύρεση της κρυμμένης πλατφόρμας περιλαμβάνει τέσσερις δοκιμασίες / ημέρα. Η εκπαίδευση γίνεται ως εξής: Ο επίμυς τοποθετείται στο κέντρο ενός τυχαία επιλεγμένου τεταρτημορίου, εκτός από αυτό που περιέχει την πλατφόρμα, και αφήνεται να κολυμπήσει ελεύθερα έως ότου φτάσει στην κρυμμένη πλατφόρμα και ακουμπήσει πάνω της με τις μπροστινές πατούσες του. Εάν το ζώο δεν εντοπίσει την πλατφόρμα μετά από 60 δευτερόλεπτα, τοποθετείται στην πλατφόρμα από τον πειραματιστή. Το ζώο αφήνεται στην πλατφόρμα για 15 δευτερόλεπτα για να μπορέσει να προσανατολισθεί με βάση τα εξωγενή χωρικά σημεία αναγνώρισης και τη θέση της κρυμμένης πλατφόρμας. Μετά τα 15 δευτερόλεπτα, το ζώο μεταφέρεται εκτός πισίνας και τοποθετείται κάτω από μια ζεστή πηγή. Η δοκιμασία της εκπαίδευσης επαναλαμβάνεται με πανομοιότυπο τρόπο άλλες τρεις φορές την ίδια

μέρα (σύνολο 4 δοκιμασίες εκπαίδευσης/ημέρα) και με μεσοδιάστημα 15 δευτερολέπτων. Το κριτήριο για τη λήξη της δοκιμασίας εκπαίδευσης είναι όταν η ομάδα των ζώων, στα οποία χορηγείται φυσιολογικός ορός 5 λεπτά πριν τη δοκιμασία, χρειάζονται κατά μέσο όρο και στις τέσσερις δοκιμασίες μιας ημέρας ≤ 10 δευτερόλεπτα για να εντοπίσουν την κρυμμένη πλατφόρμα. Η τοποθεσία της πλατφόρμας παραμένει η ίδια σε κάθε ζώο σε όλη τη διάρκεια της εκπαίδευσης. Η τοποθεσία της πλατφόρμας ήταν διαφορετική για κάθε ζώο για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ομαδικής απόδοσης.

Η πειραματική δοκιμασία (probe trial) πραγματοποιείται 3,5-4,5 ώρες μετά από την ολοκλήρωση της δοκιμασίας εκπαίδευσης και του τελευταίου ζώου. Οι επίμυες τοποθετούνται στην πισίνα κατά τον ίδιο τρόπο όπως και κατά την εκπαίδευση, αλλά η πλατφόρμα διαφυγής λείπει. Η μια και μοναδική πειραματική δοκιμασία διαρκεί 60 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια το ζώο επιστρέφει στο κλουβί του. Δύο ημέρες μετά την πειραματική διαδικασία, μια εμφανής πλατφόρμα τοποθετείται στην πισίνα αντί της κρυμμένης.

Για τις επόμενες δύο ημέρες διεξάγονται κάθε μέρα τέσσερις δοκιμασίες με τον ίδιο τρόπο όπως και πριν, με τη διαφορά ότι η πλατφόρμα είναι εμφανής και η θέση της αλλάζει σε κάθε δοκιμασία.

Τα δεδομένα που αξιολογούνται σε κάθε δοκιμασία εκπαίδευσης (training trial) είναι: 1) το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι να βρουν τα ζώα την πλατφόρμα, 2) η ταχύτητα με την οποία κολυμπούν και 3) ο προσανατολισμός τους.

Στην probe δοκιμασία αξιολογούνται ακόμη 1) ο χρόνος που τα ζώα πέρασαν σε κάθε τεταρτημόριο της δεξαμενής, 2) πόσες φορές η πορεία των ζώων διασταυρώθηκε με την προηγούμενη θέση της πλατφόρμας.

Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις δοκιμασίες εκπαίδευσης με την κρυμμένη αλλά και την εμφανή πισίνα αναλύονται με RMANOVA. Τα δεδομένα από την πειραματική δοκιμασία αναλύονται με ANOVA.

Ιστολογική Ανάλυση

Για κάθε ζώο έγινε ιστολογική επιβεβαίωση της σωστής τοποθέτησης της κάνουλας. Σε 70% περίπου των ζώων, μικροενέθηκε fast green dye (3 II σε 1.5 λεπτά) αμέσως πριν από την ευθανασία του ζώου με CO₂. Οι εγκεφαλοι αυτοί εξετάστηκαν για την εξάπλωση της χρωστικής στις κοιλίες. Για τα υπόλοιπα ζώα, οι εγκεφαλοί τους αφαιρέθηκαν αμέσως μετά την ευθανασία και αποθηκεύτηκαν σε 8% διάλυμα formaldehyde. Από τους πρόσθιους εγκεφάλους που αποθηκεύτηκαν στην formaldehyde έγιναν τομές πάχους 60 μm και χρησιμοποιήθηκε 0.1% thionin. Οι τομές μελετήθηκαν σε στερεοσκοπικό μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση της θέσης της κάνουλας και των μικροενέσεων. Στις περιπτώσεις που δεν επιβεβαιώθηκε η σωστή θέση της κάνουλας, τα δεδομένα των δοκιμασιών δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

Ανάλυση αποτελεσμάτων πειράματος-διεξαγωγή συμπερασμάτων

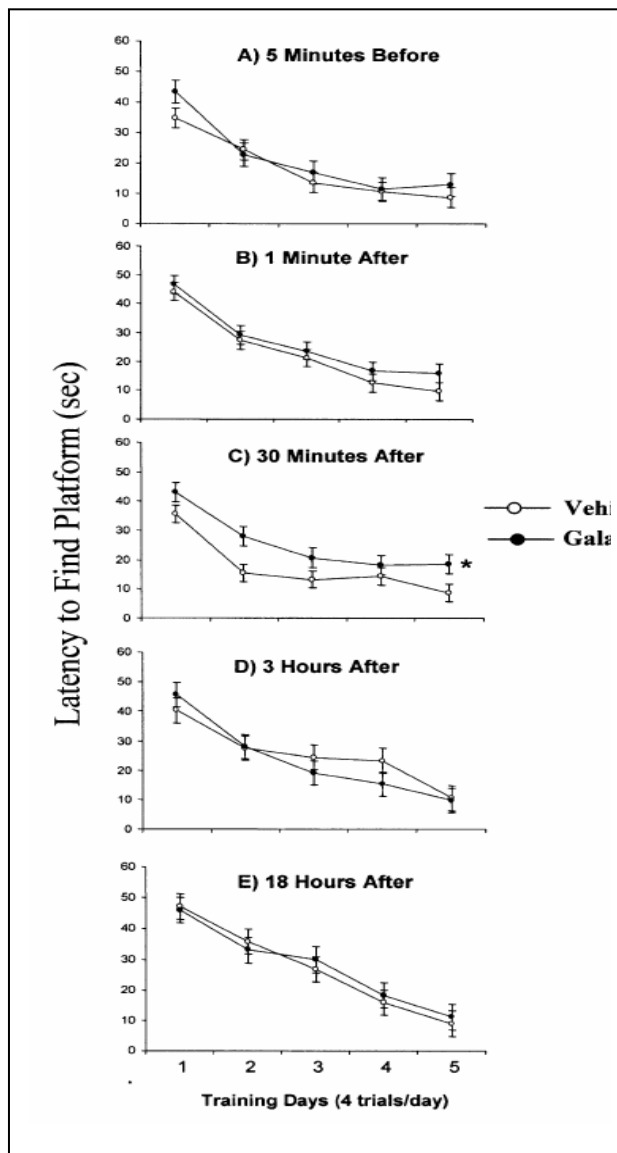
Πείραμα 1

Σε όλες τις ομάδες των ζώων παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση του χρόνου ανεύρεσης της κρυμμένης πλατφόρμας μετά από διαδοχικές δοκιμασίες εκπαίδευσης.

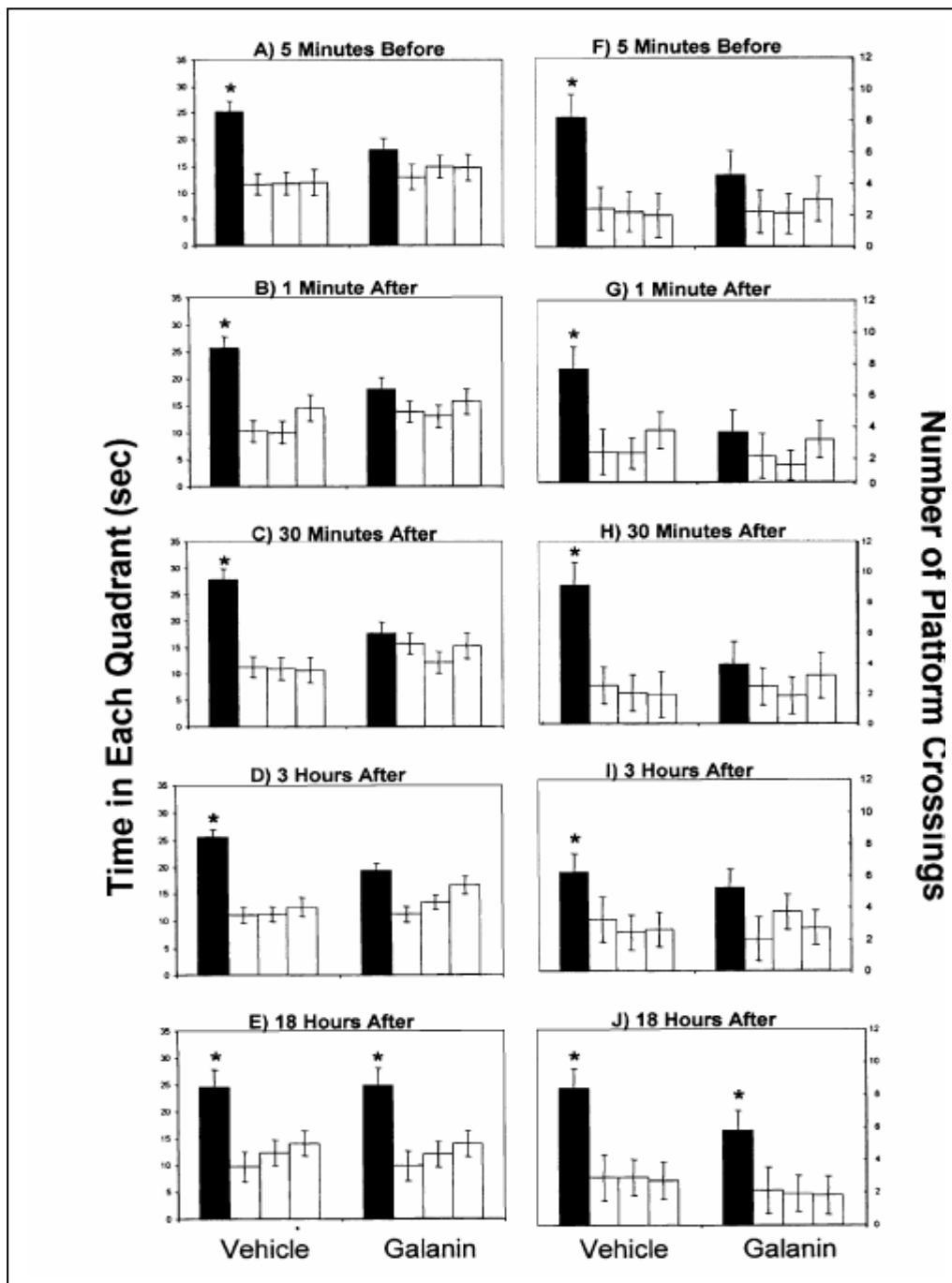
Ακόμη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ταχύτητα κολύμβησης ή στον προσανατολισμό στις ομάδες που χορηγήθηκε vehicle ή γαλανίνη.

Παρατηρούμε όμως ότι τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε γαλανίνη 30 λεπτά μετά τη δοκιμασία εκπαίδευσης παρουσιάζουν διαφορά στο χρόνο εντόπισης της κρυμμένης πλατφόρμας σε σύγκριση με τα vehicle, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε άλλες χρονικά σημεία. Το χρονικό σημείο των 30 λεπτών αντιστοιχεί στη φάση του consolidation (Γράφημα 1).

Κατά τη probe trial δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ταχύτητα κολύμβησης και στον προσανατολισμό σε όλες τις ομάδες ζώων. Αντιθέτως, οι παράμετροι που αξιολογούνται κατά τη δοκιμασία αυτή παρουσίασαν διαφορές στις ομάδες των ζώων που χορηγήθηκε γαλανίνη σε όλα τα χρονικά σημεία εκτός από τις 18 ώρες μετά τη δοκιμασία εκπαίδευσης (Γράφημα 2).



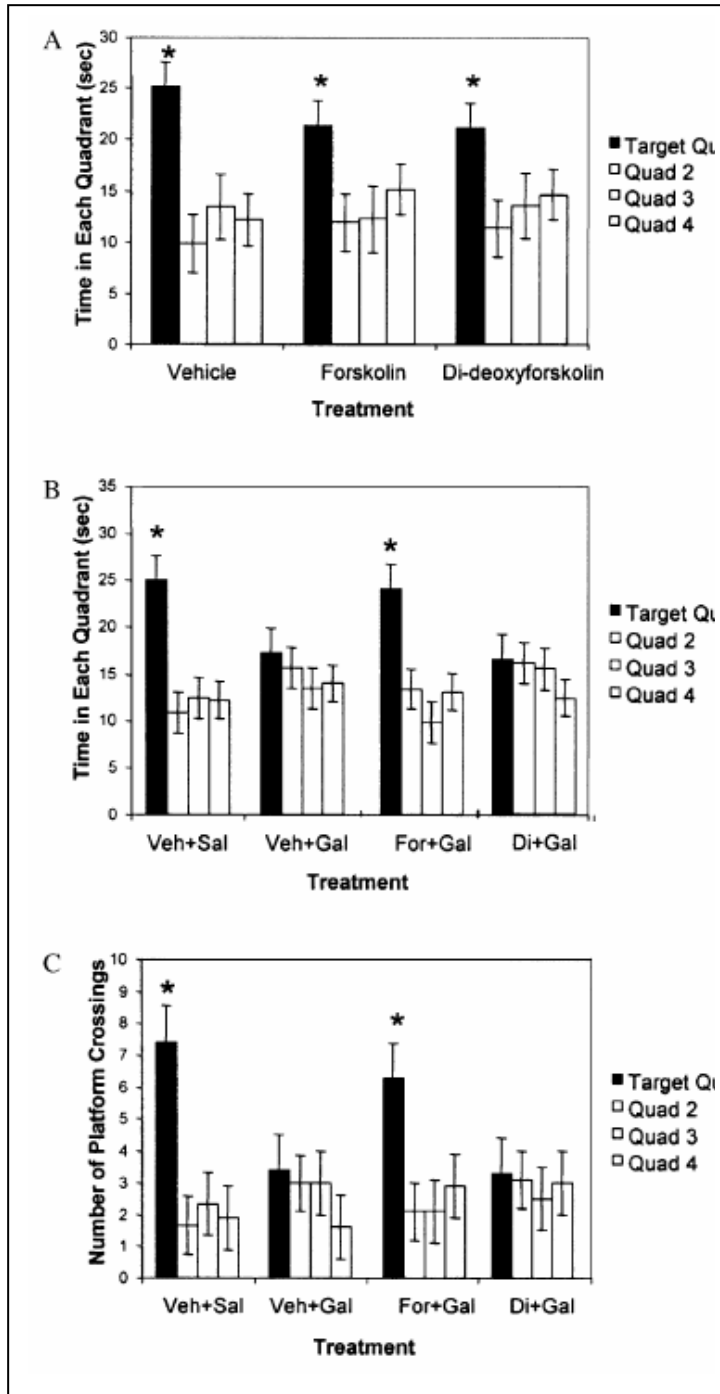
Γράφημα 1 Χρόνος ανεύρεσης κρυμμένης πλατφόρμας στις διάφορες χρονικές στιγμές χορήγησης γαλανίνης και ορού κατά τη δοκιμασία εκπαίδευσης. Παρατηρούμε ότι τα ζώα που έλαβαν τη γαλανίνη 30 min μετά τη δοκιμασία παρουσίασαν αύξηση του χρόνου σε σύγκριση με τα vehicle. Η χρονική στιγμή των 30 min αντιστοιχεί στη φάση του consolidation.



Γράφημα 2 Γραφική παράσταση δεδομένων που προέκυψαν κατά την probe trial. Οι παράμετροι που αξιολογούνται είναι ο χρόνος που πέρασε κάθε ζώο σε κάθε τεταρτημόριο (A-E) και πόσες φορές η πορεία των ζώων διασταυρώθηκε με την προηγούμενη θέση της πλατφόρμας (F-J). Παρατηρούμε ότι εκτός από τη χορήγηση στις 18 ώρες, σε όλα τα άλλα χρονικά σημεία τα ζώα που έλαβαν γαλανίνη δαπάνησαν τον ίδιο χρόνο σε όλα τα τεταρτημόρια και πέρασαν ισάριθμες φορές από το τεταρτημόριο-στόχο.

Πείραμα 2

Στην παρούσα μελέτη, η forskolin (ένας μη εκλεκτικός ενεργοποιητής της αδενυλικής κυκλάσης) εμποδίζει την εμφάνιση των ελλειμμάτων που προκαλεί η γαλανίνη στη δοκιμασία εκπαίδευσης και στη probe trial (Γράφημα 3).



Γράφημα 3 Ανατροπή της δράσης της γαλανίνης από τη forskolin. Κατά την probe trial παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά και στις δύο παραμέτρους στις ομάδες των ζώων που έλαβαν forskolin, di deoxyforskolin και στα vehicle. Στις ομάδες που έλαβαν γαλανίνη ή συνδυασμό γαλανίνης με di deoxyforskolin δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στους χρόνους. Το φαινόμενο αυτό όμως δεν παρατηρείται όταν η γαλανίνη χορηγείται σε συνδυασμό με τη forskolin, που είναι ένας εκλεκτικός ενεργοποιητής της αδενυλικής κυκλάσης.

Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η forskolin επαρκεί για να διατηρήσει την διαδικασία του consolidation την οποία αναστέλλει η γαλανίνη. Η di-deoxyforskolin (ένα ανάλογο της forskolin που δεν ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση) δεν επηρεάζει το έλλειμμα απόδοσης που προκαλεί η γαλανίνη, παρέχοντας ένα αρνητικό μάρτυρα στη δοκιμασία. Επομένως θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η γαλανίνη προκαλεί μνημονικά ελλείμματα μέσω της αναστολής του συστήματος της αδενυλικής κυκλάσης, μια δράση που αναστρέφεται από έναν ενεργοποιητή του συστήματος αυτού.

Οι υποδοχείς του γλουταμικού ευθύνονται για το encoding και το retrieval στην συνδυαστική-συσχετιστική μάθηση (paired-associate learning)

Πρόσφατα στο περιοδικό Nature οι M. Day, R. Langston και R.G.M. Morris δημοσίευσαν τα αποτελέσματα μιας νέας πειραματικής συμπεριφορικής τεχνικής που ελέγχει τη συνδυαστική-συσχετιστική μάθηση. Παρουσιάζεται ένα νέο παράδειγμα στο οποίο οι επίμυες κωδικοποιούν σε μια μόνο δοκιμασία, η οποία επαναλαμβάνεται κάθε μέρα, δύο «συνδυασμένες συσχετίσεις» και επιδεικνύουν πέρα από την τύχη, ανάκληση του ενός εκ των δύο στοιχείων του συνδυασμού (μια χωρική θέση) εάν τους δοθεί ως ένδειξη το άλλο στοιχείο (μια συγκεκριμένη τροφή).

Σε μια πρώτη μελέτη, ο συνδυασμός μιας τροφής και της θέσης της δεν επαναλήφθηκε ποτέ, διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο μια μοναδική «τι-που» συμπεριφορά σε ένα απλό χωρικό περιβάλλον. Η συνδυαστική-συσχετιστική μάθηση (paired-associate learning) χρησιμοποιείται συχνά για τον έλεγχο της episodic memory στον άνθρωπο. Το μπλοκάρισμα των NMDA υποδοχέων στον ιππόκαμπο- ο οποίος είναι σημαντικός, όπως προαναφέρθηκε, για συγκεκριμένες μορφές συναπτικής πλαστικότητας- επηρέασε το encoding αλλά δεν είχε καμιά επίδραση στο recall. Απενεργοποίηση της νευρικής δραστηριότητας του ιππόκαμπου μπλοκάροντας τους AMPA υποδοχείς επηρέασε τόσο το encoding όσο και το recall.

Ζώα

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί Lister hooded επίμυες, ηλικίας 3 μηνών.

Πειραματική διάταξη

Χρησιμοποιήθηκε μια αρένα φτιαγμένη από Perspex (διαστάσεις 1,6 m x1,6 m, 0,3 m οι πλευρικοί τοίχοι). Τέσσερα κουτιά έναρξης (start boxes) (διαστάσεις: 0,3 m x 0,3 m) τοποθετήθηκαν κεντρικά σε κάθε τοίχο με πόρτες που ανοιγοκλείνουν και επιτρέπουν πρόσβαση στην αρένα. Η αρένα αποτελείται από 49 δοχεία φαγητού (διαστάσεις: διάμετρος 7 cm και βάθος 4 cm) τα οποία είναι καλυμμένα με καπάκια από το ίδιο υλικό με την αρένα. Δύο μη χρησιμοποιούμενες θέσεις (σειρά, κολώνα: 4,2 και 4,6) καλύπτονταν από 2 σημεία οδηγούς, ύψους 20 cm. Κάθε δοχείο φαγητού περιείχε άμμο αρωματισμένη με μείγμα όλων των γεύσεων και αλλαζόταν συχνότατα. Ένα ή περισσότερα από τα δοχεία είναι δυνατόν να είναι ανοικτά σε μια sample trial ή σε μια choice trial και να περιέχει τροφή μιας συγκεκριμένης γεύσης (a food pellet). Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 28 γεύσεις, (α) απλές όπως αμύγδαλο, μήλο, μπέικον, μπανάνα, μπράντυ, βούτυρο, κανέλα, κ.α και (β) σύνθετες όπως μπανάνα+cherry, μήλο+κανέλα, κ.α (Πίνακας 3).

Πειραματική διαδικασία

Η όλη διαδικασία καταγράφηκε από κάμερες.

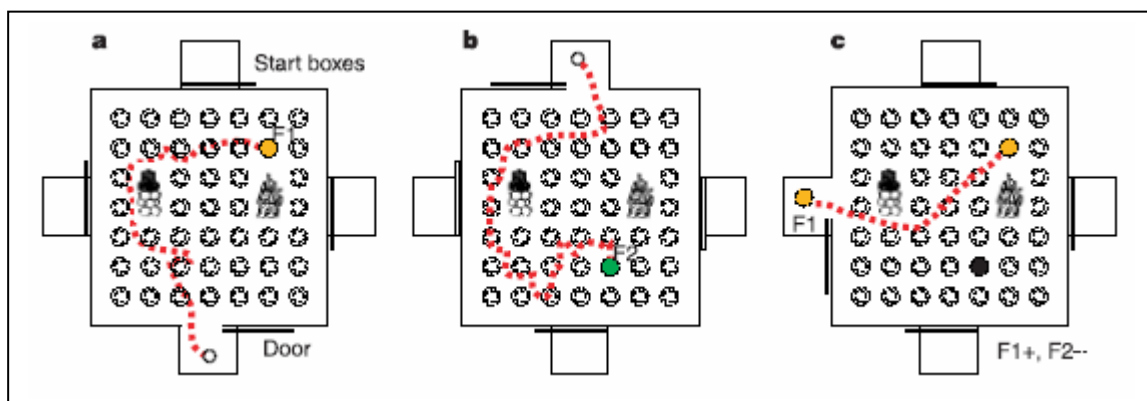
Συνολικά εκπαιδεύτηκαν 16 ζώα, τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των οκτώ και σε υποομάδες των τεσσάρων.

Η διαδικασία εξοικείωσης (habituation), διάρκεσε πέντε ημέρες. Την πρώτη ημέρα μόνο η θέση 4,4 ήταν ανοικτή και δεν περιείχε τροφή. Τη δεύτερη μέρα τοποθετήθηκε μια pellet τροφής, 1 gr., χωρίς γεύση, στο κέντρο της αρένας. Η επιλογή ενός από τα κεντρικά δοχεία έγινε για να αντισταθμιστεί η έμφυτη ροπή των επίμυων να κινούνται στην περιφέρεια της αρένας. Σταδιακά η τροφή θαβόταν όλο

και πιο βαθιά στην άμμο του δοχείου, έτσι ώστε να μάθουν τα ζώα να σκάβουν για την ανεύρεση της τροφής. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι τα ζώα προτιμούσαν στην πλειοψηφία τους να μεταφέρουν και να καταναλώνουν την τροφή είτε κοντά στα σημεία εισόδου είτε μέσα στο start box.

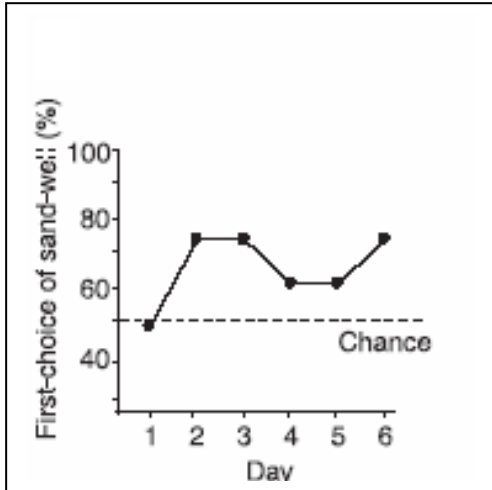
Η διαδικασία εκπαίδευσης (training) επαναλαμβανόταν για πέντε συνεχείς ημέρες και περιλάμβανε δύο sample trials και μια choice trial. Στην πρώτη sample trial ο επίμυς μπαίνει στην αρένα από ένα από τα start boxes και ξεκινά να ψάχνει για το ένα και μοναδικό ανοικτό δοχείο σε μια συγκεκριμένη θέση, L_1 , στο οποίο μπορεί να σκάψει και να βρει μια pellet τροφής 1 gr. μιας συγκεκριμένης γεύσης, F_1 , (Εικόνα 15a). Δύο λεπτά αργότερα ο επίμυς επαναλαμβάνει την ίδια δοκιμασία (δεύτερη sample trial), αλλά με διαφορετική γεύση, F_2 και σε διαφορετική θέση αυτή τη φορά, L_2 , (Εικόνα 15b). Τις δύο sample trials ακολουθεί μια choice trial. Η τελευταία είναι μια «ανταμειβόμενη» επιλογή (rewarded choice). Στον επίμυ, πριν την είσοδό του στην αρένα, δίνεται μια «ένδειξη επανάκλησης» (recall cue) που είναι μια pellet τροφής 500 mgr. που έχει μια από τις δύο προηγούμενες γεύσεις, σε ένα διαφορετικό start box αυτή τη φορά. Το ζώο έχει 30 δευτερόλεπτα για να φάει την τροφή και στη συνέχεια η πόρτα του start box ανοίγει και το ζώο βγαίνει στην αρένα. Κατά την choice trial στην αρένα υπάρχουν τώρα δύο ανοικτά δοχεία, L_1 και L_2 . Εάν ο επίμυς έχει λάβει ως ένδειξη την F_1 , το ζώο ανταμειβεται με 1 gr. pellet της γεύσης F_1 , πηγαίνοντας και σκάβοντας στη θέση L_1 . Εάν ο επίμυς έχει λάβει ως ένδειξη την F_2 , το ζώο ανταμειβεται με 1 gr. pellet της γεύσης F_2 , πηγαίνοντας και σκάβοντας στη θέση L_2 (Εικόνα 15c). Την επόμενη μέρα επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία (2 sample trials, 1 choice trial) αλλά επιλέγεται νέο ζευγάρι γεύσεων και θέσεων. Η εκπαίδευση των ζώων διήρκεσε 8 εβδομάδες.

Κατά τη διάρκεια των sample trials, οι επίμυες είχαν τα κεφάλια τους κοντά στο πάτωμα της αρένας, κάνοντας μικρές πλάγιες κινήσεις, ψάχνοντας το μοναδικό δοχείο που ήταν ανοικτό. Στη choice trial, τα ζώα κατευθύνονται σχεδόν κατευθείαν σε ένα από τα δύο δοχεία L_1 ή L_2 , χωρίς να επιδεικνύουν αυτές τις κινήσεις του κεφαλιού, γεγονός που αποδεικνύει ανάκληση της θέσης της τροφής.



Εικόνα 15 Η αρένα. a. Το ζώο τρέχει μέσα στην αρένα (διακεκομμένη γραμμή) κάνοντας πλάγιες κινήσεις του κεφαλιού για να βρει την τροφή στο F_1 (πορτοκαλί). b. Στη δεύτερη sample trial έχουμε διαφορετική τροφή F_2 (πράσινο) σε διαφορετική θέση. c. Η choice trial ξεκινά με την επίδειξη μιας εκ των δύο γεύσεων (για παράδειγμα εδώ με την F_1) ενώ το ζώο ανταμειβεται για τη σωστή επιλογή με μια pellet τροφής.

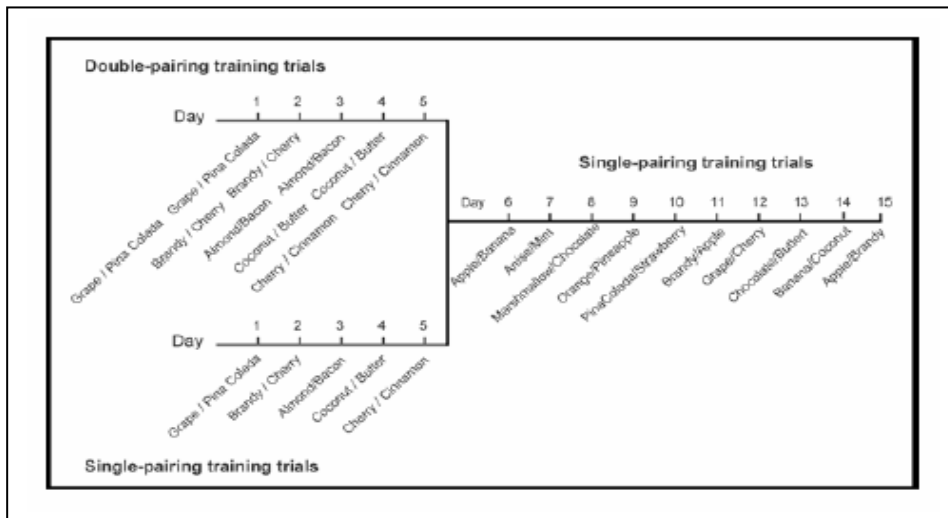
Μετά από 6 μόνο ημέρες εκπαίδευσης, η επιλογή ήταν σωστή κατά $70,0 \pm 7,6\%$ (μέσο όρο) σε σύγκριση με αυτό που παρατηρείται σε αυθόρμητη επιλογή (Γράφημα 4) (ομάδα επίμυων που εκπαιδεύτηκαν με τη μονή-συνδυαστική διαδικασία, βλέπε παράρτημα 4).



Γράφημα 4 Γρήγορη μάθηση κατά τις πρώτες 6 ημέρες της εκπαίδευσης. Οι επίμυες (n=8) είχαν καλύτερη απόδοση από αυτή που αναμενόταν σαν τυχαίο γεγονός.

Το ποσοστό αυτό ήταν μικρότερο στην ομάδα των ζώων που εκπαιδεύτηκαν με τη διπλή συνδυαστική διαδικασία ($57.5 \pm 8.8\%$). Μετά τις πρώτες 5 ημέρες του training και τα 16 ζώα συνέχισαν την εκπαίδευσή τους με μονή-συνδυαστική διαδικασία (Γράφημα 5).

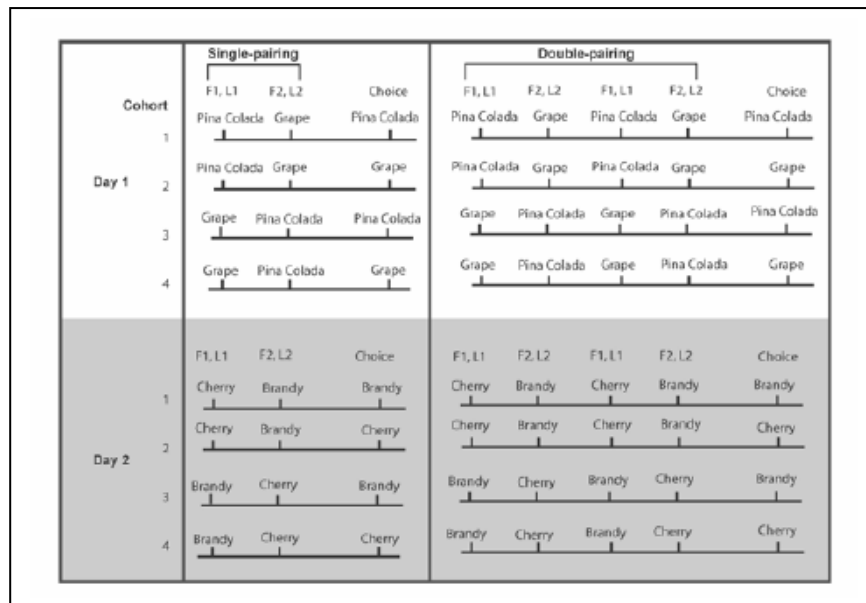
Γράφημα 5 Σχηματική παράσταση της εκπαίδευσης κατά τις πρώτες 15 ημέρες. Η διπλή-συνδυαστική διαδικασία εγκαταλείφθηκε μετά την πρώτη εβδομάδα. Τα 12 ζώα που εμφάνισαν την καλύτερη απόδοση κατά τη διάρκεια του habituation και του training επιλέχθηκαν μετά τη 15 ημέρα του training (6 ζώα από κάθε ομάδα).



Παράρτημα 4- Μονή-,διπλή-συνδυαστική διαδικασία

Αν και ήταν πολύ πιθανό ότι η νέα συνδυαστική-συσχετιστική μάθηση θα κωδικοποιούνταν σε μια και μόνο διαδικασία εκπαίδευσης, οι πολλαπλές παρουσιάσεις που συνήθως χρησιμοποιούνται σε μελέτες της μνήμης έκανε αναγκαίο τον πειραματισμό μεταξύ μιας μονής-συνδυαστικής διαδικασίας και μιας διπλής-συνδυαστικής διαδικασίας. Στη μονή-συνδυαστική διαδικασία κάθε sample trial γίνεται μόνο μια φορά, δηλαδή υπάρχουν 2 sample trials κάθε μέρα, μια για κάθε γεύση, και ακολουθεί η choice trial. Στη διπλή-συνδυαστική διαδικασία, κάθε sample-trial επαναλαμβάνεται δύο φορές, με την ελπίδα να αυξηθεί η πιθανότητα συνδυασμού μιας συγκεκριμένης γεύσης με μια συγκεκριμένη θέση. Έχουμε λοιπόν τώρα 5 δοκιμασίες κάθε μέρα-2 sample trials για κάθε συνδυασμό γεύσης-θέσης και μετά ακολουθεί η choice trial (Γράφημα 5).

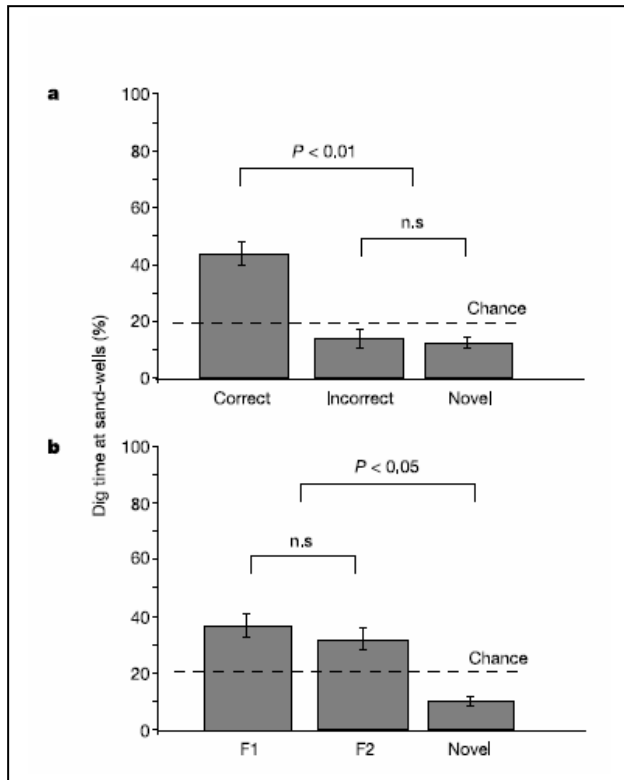
Στην πράξη βρέθηκε ότι στη διπλή-συνδυαστική διαδικασία τα ζώα είχαν πιο άσχημη απόδοση. Η απόδοση της υποομάδας των 8 επίμυων που εκπαιδεύτηκαν αρχικά για πέντε μέρες με διπλή-συνδυαστική διαδικασία ήταν πιο φτωχή από την υποομάδα της μονής-συνδυαστικής διαδικασίας. Ανάλυση των δεδομένων απέδειξε ότι η διπλή-συνδυαστική διαδικασία οδήγησε τα ζώα στο να σχηματίσουν μια προτίμηση ανάμεσα στις δύο γεύσεις. Καθώς η τροφή υπήρχε δύο φορές στην κάθε θέση πριν τη choice test, οι επίμυες ίσως αγνοούσαν τη γεύση της τροφής-ένδειξης στο start box και αντιθέτως επέλεγαν να πάνε στη θέση της τροφής που τους άρεσε καλύτερα.



Γράφημα 6 Δύο ζώα θα λάμβαναν το Δείγμα F_1 , μετά το Δείγμα F_2 και μια choice trial στην οποία η ένδειξη θα ήταν είτε το F_1 είτε το F_2 . Δύο άλλα ζώα θα λάμβαναν το Δείγμα F_2 , μετά το Δείγμα F_1 και μια choice trial στην οποία η ένδειξη θα ήταν είτε το F_2 είτε το F_1 . (Αρχικά κατά τις πρώτες 5 ημέρες και τη μονή και για τη διπλή-συνδυαστική διαδικασία). Αυτό αποτελεί ένα μοντέλο 2 x 2.

Τα 12 ζώα που εμφάνισαν την καλύτερη απόδοση κατά τη διάρκεια του habituation και του training επιλέχθηκαν μετά τη 15 ημέρα του training (6 ζώα από κάθε αρχική ομάδα μονής και διπλής-συνδυαστικής διαδικασίας, βλέπε παράρτημα 4) και χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω στάδια του πειράματος.

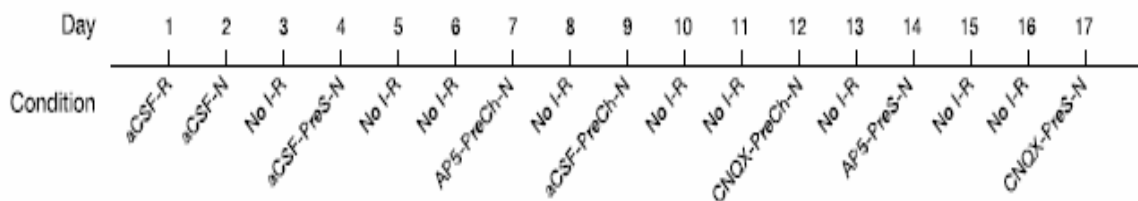
Για να ελεγχθεί ότι η ανάκληση της μνήμης στην choice trial δεν ήταν το αποτέλεσμα της μυρωδιάς της τροφής, σχεδιάστηκαν δύο μη-ανταμειβόμενες δοκιμασίες (non-rewarded probe test) που διήρκεσαν 10 ημέρες. Στις δοκιμασίες αυτές δεν υπήρχε τροφή ως ανταμοιβή σε καμία από τις δύο θέσεις στην choice trial. Τα 12 ζώα που επιλέχθηκαν εκπαιδεύτηκαν περαιτέρω με τη μονή-συνδυαστική διαδικασία για ακόμη 10 ημέρες. Στο πρώτο probe test εξετάστηκε τι θα συμβεί εάν κατά την choice trial είναι ανοικτό και ένα τρίτο δοχείο (θέση L_3 3,5) το οποίο δεν ήταν ανοικτό κατά τις δύο προηγούμενες sample trials της συγκεκριμένης μέρας. Τα ζώα αφέθηκαν να σκάβουν συνολικά για 60 δευτερόλεπτα και υπολογίστηκε το ποσοστό του χρόνου που πέρασαν σε κάθε δοχείο. Παρατηρήθηκε ότι τα ζώα δαπάνησαν περισσότερο χρόνο στη θέση που αντιστοιχούσε στη γεύση-ένδειξη (Γράφημα 7a). Στο δεύτερο probe test οι επίμυες «παραπλανήθηκαν» με το να τους δοθεί μια νέα, τρίτη γεύση (F_3) σαν ένδειξη-ανάκλησης στην αρχή της choice trial. Τα ζώα στην περίπτωση αυτή έδειξαν την ίδια προτίμηση για τις δύο προηγούμενες θέσεις, L_1 και L_2 , η οποία όμως ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτή της καινούριας θέσης, L_3 (Γράφημα 7b). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι επίμυες μπορούν να κωδικοποιήσουν μια συσχέτιση μεταξύ γεύσης-θέσης με μια μόνο δοκιμασία και να επιδείξουν αργότερα ανάκληση της συσχέτισης αυτής με αφορμή μια ένδειξη.



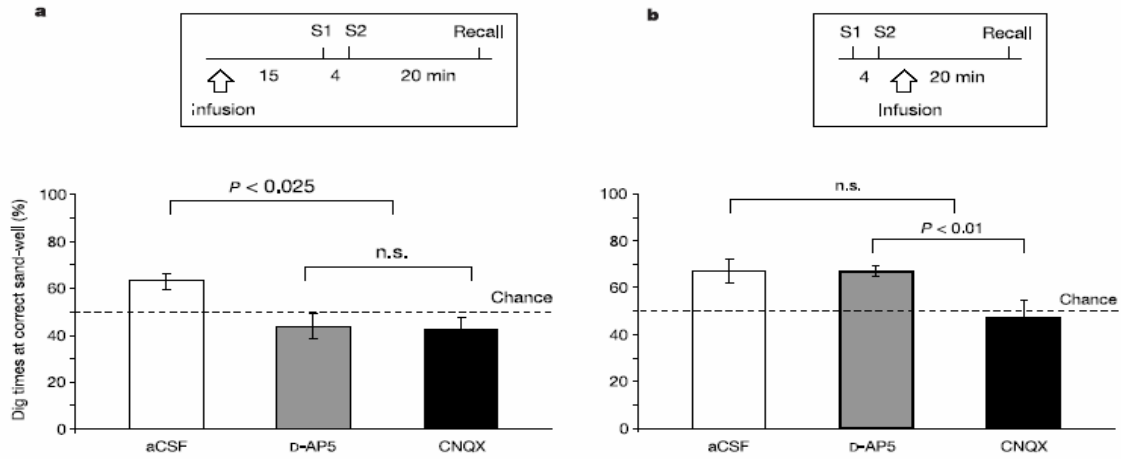
Γράφημα 7 Μη-ανταμειβόμενες δοκιμασίες (non-rewarded probe test). a. Το ποσοστό του χρόνου που δαπανήθηκε για σκάψιμο κατά την choice trial στην σωστή θέση (είχε δοθεί η ένδειξη) διέφερε σημαντικά από αυτό που δαπανήθηκε για σκάψιμο στη λανθασμένη και στη νέα θέση, στις οποίες όμως ήταν σχεδόν το ίδιο. b. Στις choice trials στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μια νέα γεύση ως ένδειξη το ποσοστό του χρόνου που δαπανήθηκε για σκάψιμο στις δύο γνωστές θέσεις δεν διέφερε, αλλά ήταν σημαντικά υψηλότερο από αυτό στην νέα θέση.

Χορήγηση φαρμάκων

Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε σαφέστατα για να ερευνηθεί εάν η ενεργοποίηση των υποδοχέων του γλουταμικού οξέως στον ιππόκαμπο διαμεσολαβεί στις διαδικασίες του encoding (κωδικοποίησης) και του retrieval (ανάκλησης). Για το λόγο αυτό εξετάστηκαν στη συνέχεια οι εκλεκτικοί ανταγωνιστές 6-κυανο-7- nitroquinoxaline (CNQX, ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων AMPA) και D(2)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5, ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA -N-methyl-D-aspartate-). Η φάση της χορήγησης των φαρμάκων ξεκίνησε περίπου 3 μήνες μετά από την έναρξη της εκπαίδευσης. Έγινε έγχυση των ουσιών αυτών ή τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού ως μάρτυρας (aCSF) μέσα στο ραχιαίο ιππόκαμπο 15 λεπτά πριν τις sample trials ή 15 λεπτά πριν την choice trials (sample και choice γίνονται με διαφορά 20 λεπτών). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, κάθε ένας από τους 12 επίμους εκπαιδεύτηκε για διάστημα 17 ημερών εκ των οποίων οι 11 ημέρες ήταν οι κανονικές μέρες εκπαίδευσης κατά τις οποίες γίνονταν η έγχυση των φαρμάκων ή του aCSF σύμφωνα με έξι συνθήκες (Γράφημα 8).



Γράφημα 8 Ενδεικτική σειρά χορήγησης των φαρμάκων σε έναν επίμου κατά τις 17 ημέρες του πειράματος. Τα D-AP5, CNQX και aCSF σημαίνουν αμφίπλευρη έγχυση in, τα R και N δείχνουν αντιστοίχως εάν η choice trial ήταν ανταμειβόμενη ή μη-ανταμειβόμενη, τα PreS και PreCh δείχνουν εάν η έγχυση ήταν πριν τη sample trial ή πριν τη choice trial. Το NoI σημαίνει ότι δεν έγινε έγχυση.

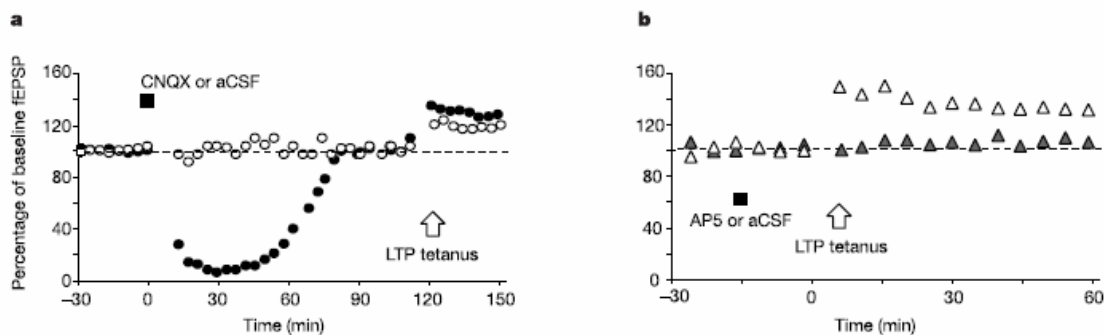


Γράφημα 9 Έγχυση των φαρμάκων. α. Η έγχυση των φαρμάκων πριν από τις sample trials έδειξε ότι τις ημέρες που έγινε έγχυση του aCSF η απόδοση των ζώων ήταν καλύτερη από ότι εάν ήταν τυχαία, ενώ η έγχυση των D-AP5 και CNQX προκάλεσε την ίδια απόδοση που ήταν στα επίπεδα του τυχαίου. β. Η έγχυση των φαρμάκων πριν από τις choice trials έδειξε ότι δεν υπάρχει διαφορά στην απόδοση των ζώων με την έγχυση του aCSF και του D-AP5 και ότι αυτή είναι καλύτερη από τα επίπεδα του τυχαίου αν συγκριθούν με την απόδοση κατά τις ημέρες του CNQX.

Αποτελέσματα

Οι επίμεις στους οποίους έγινε έγχυση aCSF είχαν καλύτερη απόδοση στην choice trial σε σύγκριση με τυχαία επιλογή, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή της έγχυσης (Γράφημα 9a, 9b). Έγχυση του D-AP5 επηρέασε την ακρίβεια της επιλογής όταν η έγχυση έγινε πριν από τις sample trials, αλλά όχι όταν έγινε μετά τις sample trials και πριν τις choice trials. Έγχυση του CNQX επηρέασε την ακρίβεια της επιλογής ανεξάρτητα από το εάν η έγχυση έγινε πριν ή μετά από τη sample trial.

Αυτός ο διαχωρισμός ήταν ένα προκαθορισμένο συμπέρασμα, αλλά έχει σημασία αν λάβουμε υπόψιν μας το ρόλο των NMDA υποδοχέων στην επαγωγή της δρασσο-εξαρτώμενης συναπτικής πλαστικότητας στον ιππόκαμπο (Γράφημα 10b) και της γρήγορης συναπτικής μεταβίβασης, που πραγματοποιείται από τους AMPA υποδοχείς, στην έκφραση αλλαγών στη συναπτική δύναμη(Γράφημα 10a).



Γράφημα 10 Διαφορετικοί υποδοχείς γλουταμικού οξέος εμπλέκονται στο encoding και στο retrieval. α. Η μέγιστη νευρική απενεργοποίηση του ιππόκαμπου εμφανίζεται 10-15 λεπτά μετά την έγχυση του CNQX και διαρκεί περίπου 60 λεπτά. β. Η έγχυση του D-AP5 δεν επηρεάζει την γρήγορη συναπτική μεταβίβαση, αλλά μπλοκάρει την επαγωγή του LTP 15 λεπτά μετά την έγχυση.

Συμπεράσματα

Από το παραπάνω πείραμα προκύπτει ότι ένα επίμυς μπορεί να κωδικοποιήσει μια νέα συσχέτιση μεταξύ μιας γεύσης μιας τροφής («τί») και μιας θέσης στο χώρο («πού») και να ανακαλέσει επιλεκτικά την σωστή θέση όταν του δοθεί ως ένδειξη η γεύση που αντιστοιχεί σε αυτή τη θέση.

Τα νευροβιολογικά ευρήματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι το μπλοκάρισμα των NMDA υποδοχέων κατά τις sample trials επηρεάζουν την κωδικοποίηση της μνήμης αλλά δεν έχουν καμιά επίδραση στην ανάκληση.

Το μπλοκάρισμα των AMPA υποδοχέων μπλοκάρει τη γρήγορη συναπτική μεταβίβαση στον ιππόκαμπο επηρεάζοντας τόσο την κωδικοποίηση της μνήμης όσο και την ανάκλησή της.

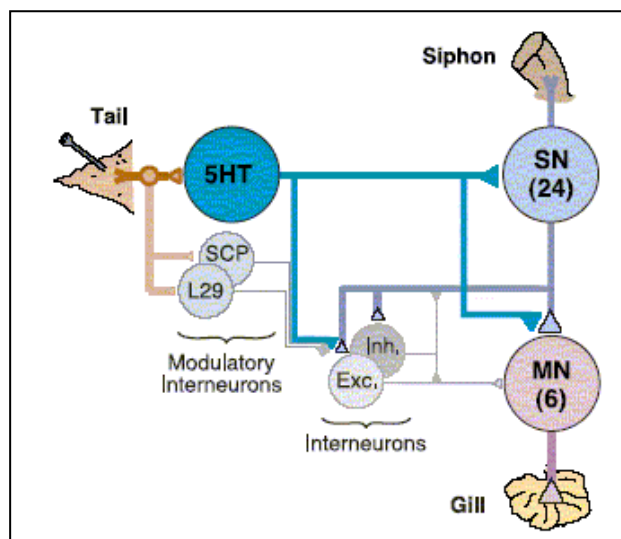
Αποτελέσματα

Περιγραφή των μοριακών μηχανισμών της implicit memory

Μεγάλο τμήμα της γνώσης μας για τους μηχανισμούς της μνήμης το οφείλουμε σε ένα θαλάσσιο οργανισμό, την Aplysia. Στη συνέχεια θα παρουσιάσουμε τα δεδομένα που προέκυψαν για τους μηχανισμούς της implicit memory χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την Aplysia.

Το γιγάντιο θαλάσσιο καλαμάρι, Aplysia, αποτελεί έναν οργανισμό εξαιρετικά χρήσιμο στη μελέτη του ΚΝΣ καθώς το νευρικό του σύστημα αποτελείται από μικρό αριθμό νευρικών κυττάρων, περίπου 20.000 και τα περισσότερα από αυτά είναι γιγάντια.

Η Aplysia παρουσιάζει μια ποικιλία αμυντικών αντανακλαστικών απόσυρσης του σιφονίου και του βράγχιού της. Τα αντανακλαστικά αυτά μπορούν να υποστούν τόσο habituation όσο και sensitization αλλά και classical conditioning όπως θα δούμε παρακάτω. Το νευρικό κύκλωμα του αντανακλαστικού απόσυρσης του βραγχίου (gill-withdrawal reflex) εντοπίζεται στο κοιλιακό γάγγλιο και αποτελείται από 24 κεντρικούς αισθητικούς νευρώνες (που περιέχουν μηχανοϋποδοχείς) οι οποίοι νευρώνουν το δέρμα του σιφονίου και σχηματίζουν απευθείας μονοσυναπτικές συνδέσεις με 6 κινητικά κύτταρα του βραγχίου (Εικ. 16). Οι αισθητικοί νευρώνες επίσης, σχηματίζουν έμμεσες συνδέσεις με κινητικά κύτταρα μέσω μικρών ομάδων διεγερτικών και κατασταλτικών ενδιάμεσων νευρώνων.



Εικόνα 16 Σχηματική παρουσίαση των αισθητικών, κινητικών και ενδιάμεσων νευρώνων που εμπλέκονται στο αντανακλαστικό απόσυρσης στην Aplysia

Sensitization (Short-term και Long-term sensitization)

Ένα επώδυνο ερέθισμα στην ουρά της *Aplysia* προκαλεί έντονη αντίδραση απόσυρσης του βραγχίου της και σε άλλα, πιο ήπια ερεθίσματα. Το φαινόμενο αυτό καλείται Sensitization και έχει μια Short-term και μια Long-term φάση.

Το Sensitization αποτελεί μια ετεροσυναπτική διαδικασία. Η αύξηση της συναπτικής δύναμης προκαλείται από ενδιάμεσους νευρώνες. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις ομάδες ενδιάμεσων νευρώνων. Από αυτούς οι πιο καλά μελετημένοι είναι αυτοί που απελευθερώνουν σεροτονίνη. Στην *Aplysia* η σεροτονίνη δρα σε τουλάχιστον έξι διαφορετικούς υποτύπους υποδοχέων, χωρίς να γνωρίζουμε ακόμα επακριβώς ποιοι υποτύποι εμπλέκονται στη μνήμη και τη μάθηση. Οι σεροτονεργικοί και οι υπόλοιποι ενδιάμεσοι νευρώνες σχηματίζουν συνάψεις με τους αισθητικούς νευρώνες, συμπεριλαμβανομένων και αξονο-αξονικές συνάψεις στα προσυναπτικά τους άκρα (Εικ. 16, 17). Οι αισθητικοί νευρώνες με τη σειρά τους σχηματίζουν συνάψεις με τα κινητικά κύτταρα (Εικ. 16, 17).

Μετά από ένα επώδυνο ερέθισμα στην ουρά, απελευθερώνονται από τους ενδιάμεσους νευρώνες σεροτονίνη και άλλοι νευρομεταβιβαστές. Η σεροτονίνη που απελευθερώνεται προσυναπτικά από τον ενδιάμεσο νευρώνα, συνδέεται σε δύο τύπους μετασυναπτικών υποδοχέων στον αισθητικό νευρώνα. Ο πρώτος από αυτούς τους υποδοχείς συνδέεται με μια G πρωτεΐνη (G_s) η οποία αυξάνει τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης. Η αδενυλική κυκλάση με τη σειρά της μετατρέπει το ATP σε cAMP και αυξάνονται με τον τρόπο αυτό τα επίπεδα του cAMP στον αισθητικό νευρώνα. Το cAMP ενεργοποιεί την cAMP εξαρτώμενη κινάση A (PKA) με το να συνδέεται στην ρυθμιστική υπομονάδα και να απελευθερώνει την καταλυτική. Η καταλυτική υπομονάδα της PKA δρα με τη σειρά της σε τρεις οδούς:

Στην οδό 1 η καταλυτική υπομονάδα φωσφορυλιώνει ιοντικούς διαύλους K^+ και έτσι αυξάνεται το ρεύμα K^+ . Η αύξηση του K^+ παρατείνει το δυναμικό και αυξάνει την είσοδο Ca^{2+} από N-τύπου διαύλους Ca^{2+} . Η αύξηση των Ca^{2+} στον αισθητικό νευρώνα προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του νευρομεταβιβαστή μεταξύ αισθητικού νευρώνα και κινητικού κυττάρου.

Στην οδό 2, συναπτικά κυστίδια που περιέχουν μεταβιβαστή κινητοποιούνται προς την ενεργό ζώνη και αυξάνεται έτσι η ικανότητα εξωκύττωσης.

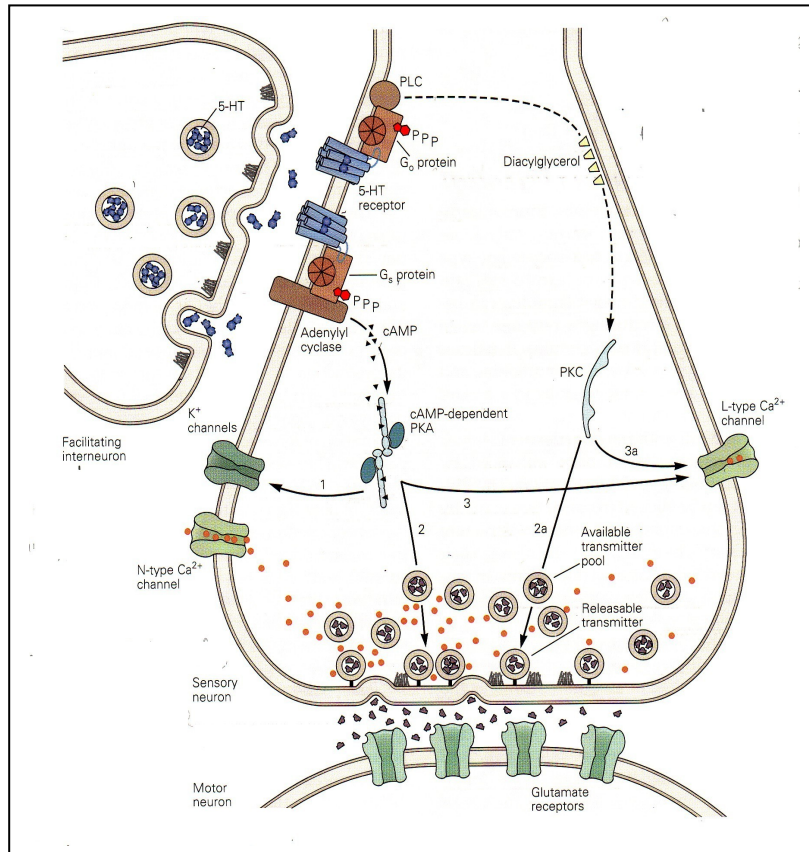
Στην οδό 3 η δράση της καταλυτικής υπομονάδας της PKA προκαλεί το άνοιγμα L τύπου διαύλων Ca^{2+} και αυξάνεται έτσι ακόμη περισσότερο η είσοδος Ca^{2+} στον αισθητικό νευρώνα.

Ο δεύτερος υποδοχέας συνδέεται με μια G πρωτεΐνη (G_o) η οποία ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC) η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί μια διαμεμβρανική διακυλογλυκερόλη με τελική κατάληξη την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Η PKC εμπλέκεται μαζί με την PKA στις οδούς 2 και 3 (Εικ. 17).

Εάν το επώδυνο ερέθισμα επαναλαμβάνεται τότε η μνήμη γίνεται πιο σταθερή και μετατρέπεται σε long term. Αναλυτικότερα, επαναλαμβανόμενο ερέθισμα προκαλεί αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων cAMP που διαρκεί αρκετά λεπτά. Οι καταλυτικές υπομονάδες της PKA τότε κινητοποιούν την πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο (MAPK) και μαζί οι δύο κινάσες μετακινούνται στον πυρήνα. Στον πυρήνα η PKA και η MAPK

1. φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την CREB πρωτεΐνη (cAMP-response element binding protein), έναν μεταγραφικό παράγοντα, και

2. αναστέλλουν την κατασταλτική δράση της CREB-2, ενός αναστολέα της CREB-1. Η CREB-1 με τη σειρά της ενεργοποιεί διάφορα γονίδια μεταξύ των οποίων και αυτό που κωδικοποιεί μια ubiquitin υδρολάση, απαραίτητη για την ελεγχόμενη πρωτεόλυση της καταλυτικής υπομονάδας της PKA. Η αποκοπή της καταλυτικής υπομονάδας της PKA οδηγεί σε συνεχή φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της PKA. Ένα δεύτερο γονίδιο που ενεργοποιείται από την CREB-1 κωδικοποιεί το C/EBP το οποίο δρα τόσο ως ομοδιμερές όσο και ως ετεροδιμερές με ενεργοποιητικό παράγοντα (AF) για την ενεργοποίηση και άλλων γονιδίων που οδηγούν στο σχηματισμό νέων συνάψεων (Εικ. 18).



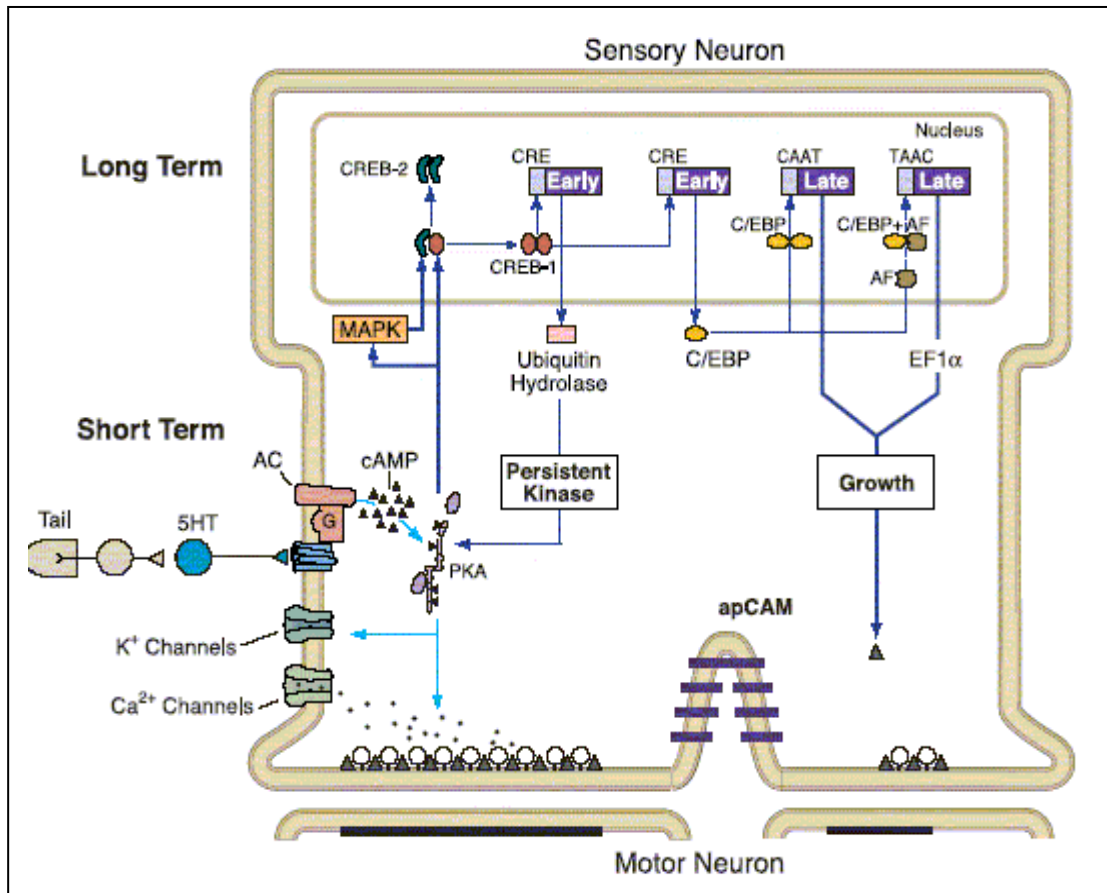
Εικόνα 17 Short-term sensitization του αντανεκλαστικού απόσυρσης στην Aplysia. Από τον ενδιάμεσο προσυναπτικό νευρώνα απελευθερώνεται σεροτονίνη η οποία συνδέεται σε μετασυναπτικούς υποδοχείς του σώματος του αισθητικού νευρώνα. Στη συνέχεια ακολουθεί ένας καταρράκτης βιοχημικών γεγονότων (βλέπε κείμενο) που οδηγεί στην απελευθέρωση γλουταμικού στη συναπτική σχισμή μεταξύ του αισθητικού και του κινητικού νευρώνα. Με τον τρόπο αυτό παράγεται το αντανεκλαστικό. Βλέπουμε δηλαδή πως ο ενδιάμεσος νευρώνας διευκολύνει τη νευρωνική μεταβίβαση μεταξύ αισθητικού και κινητικού νευρώνα.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στο Long-term sensitization χρησιμοποιούν τις ίδιες οδούς ενδοκυττάρων δεύτερων αγγελιοφόρων με το Short-term sensitization, δηλαδή το cAMP και το PKA, αλλά όπως συμβαίνει με τη long term memory, έχουμε τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών.

Στο Long-term sensitization βλέπουμε ότι οι καταλυτικές υπομονάδες συνεχίζουν να φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες σημαντικές για την αύξηση της απελευθέρωσης των μεταβιβαστών και να ενισχύουν τις συνάψεις μέσω της CREB-1, για μεγάλο χρονικό

διάστημα μετά την επιστροφή του δευτέρου αγγελιοφόρου cAMP στα φυσιολογικά του επίπεδα και ενώ το ερέθισμα παύει να υφίσταται.

Παρατηρούμε ακόμη ότι κατά τη διαδικασία αποθήκευσης της long term memory ενεργοποιείται ένας στενά ελεγχόμενος καταρράκτης γονιδιακής έκφρασης. Τα κατασταλτικά γονίδια της μνήμης παρέχουν ένα κατώφλι ή καλύτερα ένα σημείο ελέγχου της αποθήκευσης τα μνήμης. Οι καταστολείς της μνήμης ίσως επιτρέπουν την μεταβολή της αποθηκευμένης μνήμης από συναισθηματικά ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα μια μνήμη ενός συναισθηματικά φορτισμένου γεγονότος να επανέρχεται τόσο ζωντανά, με κάθε λεπτομέρεια σαν να έχει μόλις συμβεί!



Εικόνα 18 Long-term sensitization του αντανεκλαστικού απόσυρσης στην Aplysia.

Περιγραφή των μοριακών μηχανισμών της explicit memory

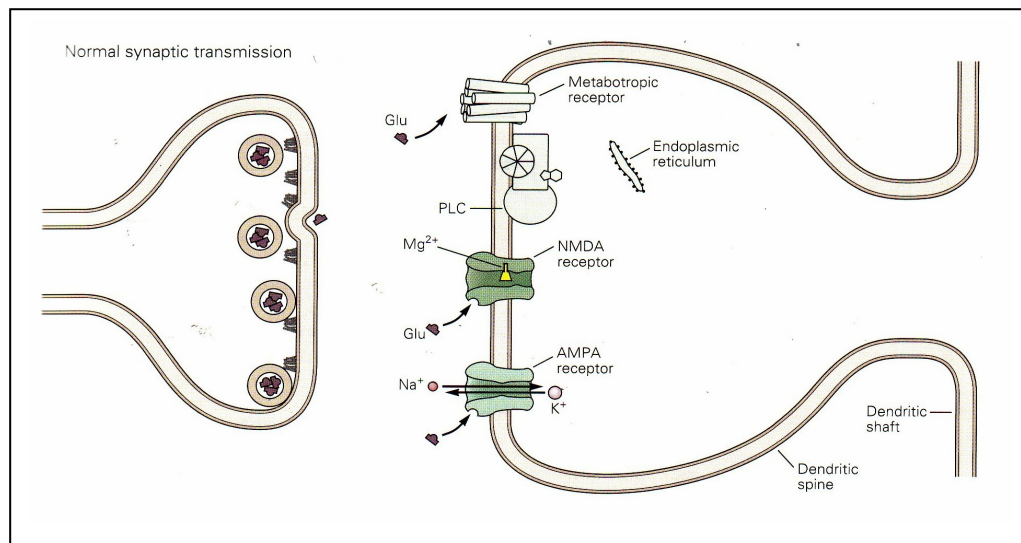
Είναι πλέον καθολικά αποδεκτό ότι ο ιππόκαμπος παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της χωρικής μνήμης στα θηλαστικά. Το LTP αποτελεί τη μοριακή βάση αυτής της διαδικασίας. Για το λόγο αυτό οι μελέτες για τη μνήμη έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη του LTP. Στη συνέχεια επιχειρείται μια προσπάθεια περιγραφής των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στο LTP.

Πώς παράγεται το LTP;

Βρέθηκε ότι το γλουταμικό οξύ είναι ο βασικός νευρομεταβιβαστής που εμπλέκεται στο LTP. Το γλουταμικό οξύ δρα σε δύο τύπους υποδοχέων, ιοντοτροπικούς και μεταβοτροπικούς. Κύριο ρόλο μέχρι σήμερα θεωρείται ότι διαδραματίζουν οι

ιοντοτροπικοί υποδοχείς αν και συνεχώς προκύπτουν νέα στοιχεία για την εμπλοκή και των μεταβοτροπικών υποδοχέων στη συναπτική πλαστικότητα και στο σχηματισμό της μνήμης (Salinska and Stafiej, 2003).

Στο Schaffer collateral pathway και Perforant pathway ο μηχανισμός του early LTP είναι ο ίδιος. Αναλυτικότερα, φυσιολογικά σαν απάντηση σε ένα ερέθισμα, απελευθερώνεται γλουταμικό οξύ από τους προσυναπτικούς νευρώνες και δρα τόσο στους non-NMDA (AMPA και μεταβοτροπικούς) όσο και στους NMDA υποδοχείς που αποτελούν ταυτοχρόνως και ιοντικά κανάλια. Ιόντα Na^+ και K^+ εισέρχονται στο κύτταρο από τους non-NMDA υποδοχείς αλλά όχι και από τους NMDA οι οποίοι στην κατάσταση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης, φράζονται από Mg^{2+} (Εικ. 19).

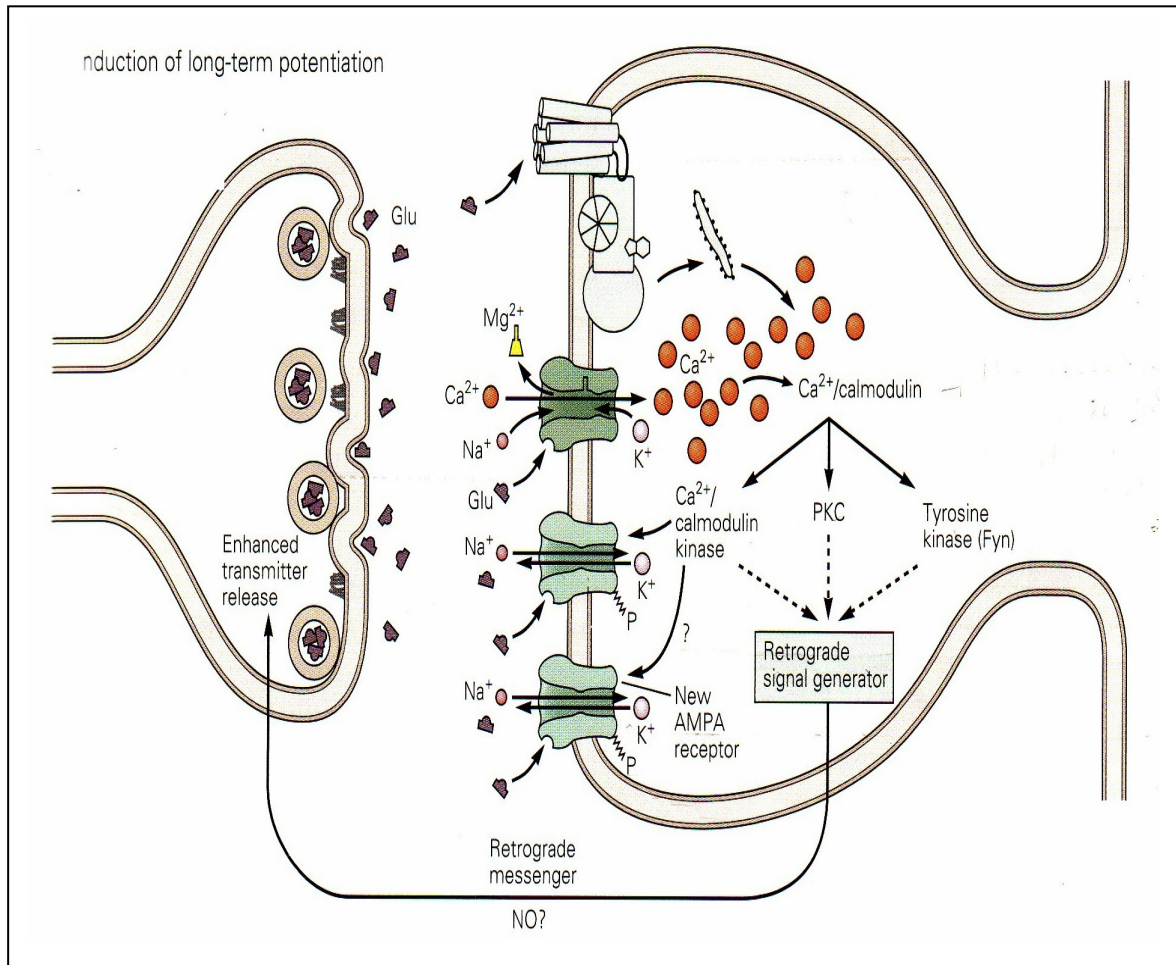


Εικόνα 19 Φυσιολογική, χαμηλής συχνότητας συναπτική μεταβίβαση. Γλουταμικό από το προσυναπτικό άκρο δρα στους υποδοχείς AMPA και μεταβοτροπικούς, οι NMDA φράσσονται από Mg^{2+} .

Όταν η μετασυναπτική μεμβράνη εκπολώνεται από τη δράση των non-NMDA υποδοχέων, όπως συμβαίνει από μια υψηλής συχνότητας σειρά ερεθισμάτων που παράγει το LTP, η εκπόλωση έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των Mg^{2+} από τους NMDA υποδοχείς. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την είσοδο Ca^{2+} μέσα από τους NMDA υποδοχείς. Η επακόλουθη αύξηση του ασβεστίου μετασυναπτικά πυροδοτεί τις Ca^{2+} - εξαρτώμενες κινάσες (CaMKII και PKC) καθώς και την τυροσινική κινάση Fyn. Μαζί, οι κινάσες αυτές παράγουν το LTP. Η CaMKII φωσφορυλιώνει τους non-NMDA υποδοχείς και αυξάνει την ευαισθησία τους στο γλουταμικό οξύ αλλά και ενεργοποιεί κάποιους άλλους «σιωπηλούς» ιοντοτροπικούς υποδοχείς. Οι αλλαγές αυτές συμμετέχουν στην διατήρηση του LTP. Επιπρόσθετα, καθόσον παράγεται το LTP, το μετασυναπτικό κύτταρο θεωρείται ότι απελευθερώνει (με άγνωστους προς το παρόν μηχανισμούς) ανάδρομους αγγελιοφόρους, ένας εκ των οποίων εικάζεται ότι είναι το NO, οι οποίοι δρουν στις κινάσες του προσυναπτικού νευρώνα για να προκαλέσουν την αύξηση της απελευθέρωσης των μεταβιβαστών η οποία με τη σειρά της συνεισφέρει στο LTP (Εικ. 20).

Εάν επαναλαμβάνεται το ερέθισμα που προκαλεί την εμφάνιση του LTP, τότε το ρεύμα Ca^{2+} επιστρατεύει την αδενυλική κινάση η οποία ενεργοποιεί μια cAMP-εξαρτώμενη κινάση. Η τελευταία μετακινείται προς τον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει

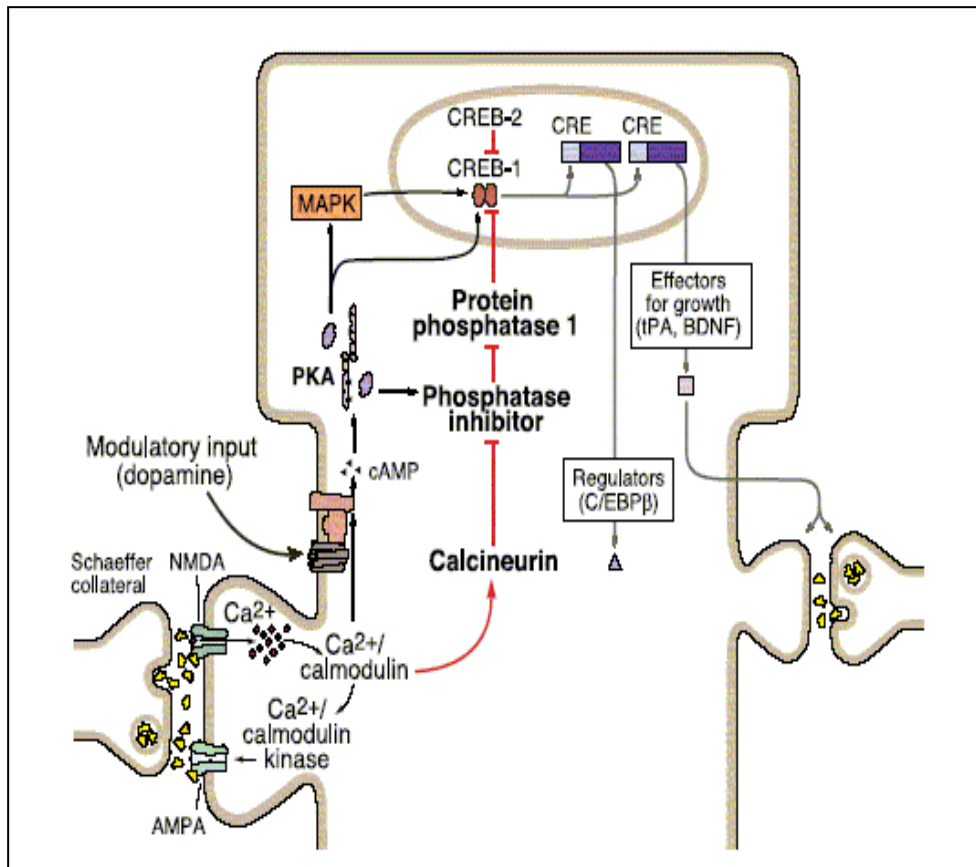
την CREB. Η CREB με τη σειρά της ενεργοποιεί στόχους που προκαλούν δομικές αλλαγές (Εικ. 21).



Εικόνα 20 Early LTP. Κατά τη διάρκεια μιας σειράς ερεθισμάτων υψηλής συχνότητας που παράγουν το LTP, η μετασυναπτική μεμβράνη εκπολώνεται από τη δράση των non-NMDA υποδοχέων. Η εκπόλωση της μεμβράνης προκαλεί την απομάκρυνση των Mg^{2+} που φράζουν τους NMDA υποδοχείς. Έτσι Ca^{2+} εισέρχεται και από τους NMDA. Τα αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} ενεργοποιούν έναν καταράκτη βιοχημικών γεγονότων που συνεισφέρει στην διατήρηση του LTP μετασυναπτικά. Επιπρόσθετα, το μετασυναπτικό κύτταρο παράγει ανάδρομους αγγελιοφόρους που δρουν στον προσυναπτικό νευρώνα και ενισχύουν την απελευθέρωση του γλουταμικού.

Στο mossy fiber pathway βρέθηκε ότι το LTP εξαρτάται από την είσοδο Ca^{2+} στον προσυναπτικό νευρώνα. Το ρεύμα Ca^{2+} φαίνεται ότι ενεργοποιεί μια Ca^{2+} /καλμοδουλίνη εξαρτώμενη αδενυλική κυκλάση η οποία αυξάνει τα επίπεδα του cAMP και ενεργοποιεί την PKA στον προσυναπτικό νευρώνα. Ακόμη, το LTP στο mossy fiber pathway μπορεί να ρυθμιστεί από μετατροπικά ερεθίσματα. Τα ερεθίσματα αυτά είναι νοραδρενεργικά και εμπλέκουν β-αδρενεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση.

Βλέπουμε λοιπόν πως στην αποθήκευση της explicit memory στον ιππόκαμπο των θηλαστικών, η PKA παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην μετατροπή της short-term memory σε long-term memory.



Εικόνα 21 Late LTP. Με επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα το ρεύμα Ca^{2+} επιστρατεύει μια αδενυλική κυκλάση η οποία ενεργοποιεί μια PKA. Η τελευταία μεταφέρεται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει την CREB πρωτεΐνη. Η CREB με τη σειρά της ενεργοποιεί στόχους που πιστεύεται ότι οδηγούν σε δομικές αλλαγές.

Μελέτη των μοριακών μηχανισμών της μνήμης σε έντομα

Drosophila

Στα έντομα οι δύο πιο σημαντικές δομές του κεντρικού εγκεφάλου είναι τα αμφοτερόπλευρα, συμμετρικά mushroom bodies και το κεντρικό σύμπλεγμα (central complex). Το κεντρικό σύμπλεγμα εμπλέκεται κυρίως στη ρύθμιση της συμπεριφορικής δραστηριότητας ενώ τα mushroom bodies είναι υπεύθυνα για τον ανώτερο έλεγχο συγκεκριμένων κινητικών προγραμμάτων, της μνήμης και της μάθησης. Τα mushroom bodies αποτελούν το πιο σημαντικό νευρωνικό κύκλωμα που συνδέεται με τη μνήμη και τη μάθηση στα έντομα, ειδικά όταν αυτή προκαλείται από οσφρητικά ερεθίσματα. Τα mushroom bodies αποτελούνται από νευρικά κύτταρα, τα Kenyon cells. Η μνήμη σχηματίζεται εν μέρει από τη μεταβολή της φυσιολογίας των νευρώνων την οποία προκαλούν νευροπεπτίδια. Τα νευροπεπτίδια αυτά είναι προϊόντα του γονιδίου *amnesiac* και απελευθερώνονται από πεπτιδεργικούς νευρώνες που νευρώνουν τα mushroom bodies.

Μελέτες σε Kenyon cells σε ενήλικες *Drosophila* έδειξαν μια συγχρονισμένη ταλάντωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου με μια μέση περίοδο 4 λεπτών. Το εύρος της ταλάντωσης αυτής μεταβάλλεται ισχυρά από τα προϊόντα του γονιδίου *amnesiac*, που είναι υπεύθυνο για *memory consolidation*. Ακόμη, σε knock

out για το γονίδιο *amnesiac* έντομα, παρατηρείται αργή και αυτόματη αύξηση της ταλάντωση των επιπέδων ασβεστίου ενδοκυττάρια στα mushroom bodies. Τα παραπάνω είναι ενδεικτικά των μοριακών μηχανισμών μνήμης στη *Drosophila*.

Apis mellifera

Στη μέλισσα *Apis mellifera* η διαδικασία της μνήμης συνδέεται με συστήματα δευτέρων αγγελιοφόρων που προκαλούν τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Διαφορετικές μορφές της οσφρητικής μνήμη στη μέλισσα εξαρτώνται από διαφορετικά συστήματα δευτέρων αγγελιοφόρων, μιας cAMP εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης μέσω PKA και μιας Ca²⁺/phospholipids εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης μέσω PKC. Επομένως, μεγάλο ενδιαφέρον για τη μελέτη της μνήμης παρουσιάζει η εντόπιση των PKA και PKC στα νευρωνικά κυκλώματα που εμπλέκονται στη μνήμη, όπως τα mushroom bodies και τα antennal lobes. Με μεθόδους ανοσοϊστολογίας έγινε μια συγκριτική μελέτη της κατανομής των PKA και PKC στον εγκέφαλο της μέλισσας με εστίαση στα antennal lobes και στα mushroom bodies, δομές που εμπλέκονται στην οσφρητική μνήμη.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστολογικής μελέτης έδειξαν ότι PKA εντοπίζεται παντού στον εγκέφαλο ενώ η Ca²⁺/phospholipids εξαρτώμενη PKC εντοπίζεται κυρίως στα antennal lobes και στα mushroom bodies. Στα antennal lobes, η PKAII εντοπίζεται στους αισθητικούς νευρώνες και στους ενδιάμεσους νευρώνες. Αντιθέτως, η ανοσοσήμανση της PKC οφείλεται αποκλειστικά στους ενδιάμεσους νευρώνες, με χαρακτηριστική επίταση της σήμανσης στην κεντρική περιοχή των antennal lobes. Τα mushroom bodies παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση σε PKC και PKAII στον εγκέφαλο. Οι PKAII και PKC εκφράζονται σε διαφορετικά επίπεδα στις διάφορες υποομάδες των Kenyon cells. Στη διαφορετική αυτή κατανομή των PKAII και PKC στα antennal lobes και στα mushroom bodies, τουλάχιστον εν μέρει, οφείλεται και ο διαφορετικός ρόλος τους στη διαδικασία της οσφρητικής μνήμης.

Συζήτηση- Μελλοντικοί Στόχοι

Στην παραπάνω μελέτη χρησιμοποιήσαμε για να περιγράψουμε τους μοριακούς μηχανισμούς της μνήμης δύο οργανισμούς με μεγάλη φυλογενετική απόσταση. Οι κυτταρικές και μοριακές στρατηγικές που χρησιμοποιεί η *Aplysia* για την αποθήκευση της short-term και long-term memory διατηρούνται στα θηλαστικά και οι ίδιοι μοριακοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην αποθήκευση τόσο της implicit όσο και της explicit memory.

Και στις δύο αυτές μορφές μνήμης υπάρχουν στάδια της μνήμης που κωδικοποιούνται ως αλλαγές στις συνάψεις. Οι short term αλλαγές των συνάψεων περιλαμβάνουν μετατροπή προϋπαρχόντων πρωτεϊνών που οδηγούν σε αλλαγές σε προϋπάρχουσες συνάψεις. Αντιθέτως, οι long-term συναπτικές αλλαγές περιλαμβάνουν ενεργοποίηση έκφρασης γονιδίων, νέα πρωτεϊνοσύνθεση και σχηματισμό νέων συνάψεων.

Παρατηρούμε ακόμη ότι ενώ η short-term αποθήκευση στην implicit και explicit memory απαιτούν διαφορετικά συστήματα μετάδοσης του σήματος, η long-term αποθήκευση και των δύο αυτών τύπων μνήμης χρησιμοποιεί ως πυρήνα την οδό των PKA, MAPK και CREB-1.

Τέλος τόσο στην implicit όσο και στην explicit memory ο διακόπτης που ρυθμίζει τη μετάβαση από τη short-term στη long-term memory είναι περιοριστικοί παράγοντες των γονιδίων.

Μέχρι σήμερα το μεγαλύτερο μέρος της μελέτης έχει εστιασθεί στους μηχανισμούς αποθήκευσης της μνήμης. Το πιο δύσκολο όμως μέρος είναι η μελέτη της μνήμης ως ένα σύστημα. Πώς αλληλεπιδρούν οι διάφορες περιοχές του εγκεφάλου; Πώς οι πληροφορίες μεταφέρονται στο νεοφλοιό για μόνιμη αποθήκευση; Πώς γίνεται άραγε η ανάκληση των πληροφοριών; Για τον ερευνητή του παρόντος και του μέλλοντος λοιπόν, υπάρχουν ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα στα οποία καλείται να δώσει λύσεις.

Βιβλιογραφία

1. Kandel, E., Schwartz, J., Thomas, J. *Principles of neural science. 4th ed* (McGraw-Hill, International Edition, 2000).
2. Alberts, B., et al. *Molecular Biology of the cell. 4th ed* (Garland Science, 2002).
3. Siegal, G. J., et al. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects 6th ed.* (Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999).
4. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. E. *Molecular Cell Biology. 4th ed* (W. H. Freeman & Co., New York, 2000).
5. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., Williams, S. M. *Neuroscience. 2nd ed.* (Sinauer Associates, Inc., Sunderland (MA), 2001).
6. Kandel, E. The molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* **294**, 1030-1038 (2001).
7. Day, M., Langston, R., Morris, R. G. M. Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. *Nature* **424**, 205-209 (2003).
8. Kinney, J. W., et al. Central galanin administration blocks consolidation of spatial learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* **80**, 42-54 (2003).
9. Salinska, E., Stafiej, A. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. *Neuroch. Inter.* **43**, 469-474 (2003).
10. Cammarota, M., et al. Participation of CaMKII in Neuronal Plasticity and Memory Formation. *Cel. Mol. Neurob.* **22**(3), 259-266 (2002).
11. Nguyen, P. V., Woo, N. H. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog. Neurobiol.* **71**(6), 401-437 (2003).
12. Abraham, W. C., Williams, J. M. Properties and mechanisms of LTP maintenance. *Neuroscientist.* **9**(6), 463-474 (2003).
13. Roberts, A. C., Glanzman, D. L. Learning in Aplysia: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci.* **26**(12), 662-670 (2003).
14. Poser, S., Storm, D. R. Role of Ca²⁺-stimulated cyclases in LTP and memory formation. *Int. J. Devl. Neuroscience* **19**, 387-394 (2001).
15. Müller, U. Second Messenger Pathways in the Honeybee Brain: Immunohistochemistry of Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Microsc. Res. Tech.* **45**, 165-173 (1999).
16. Rosay, P., Armstrong, J. D., Wang, Z., Kaiser, K. Synchronized neural activity in the Drosophila memory centers and its modulation by amnesiac. *Neuron* **30**(3), 759-770 (2001).
17. Davis, R. L. Mushroom bodies, Ca²⁺ oscillations, and the memory gene amnesiac. *Neuron* **30**(3), 653-656 (2001).