



Lek. Andrzej Królik

Udział niespecyficzných kanałów jonowych typu TRP
(z ang. transient receptor potential) przepuszczalnych
dla jonów wapnia w procesach konsolidacji i
rekonsolidacji pamięci.

The role of nonspecific TRP ion channels permeable for calcium ions
in the processes of memory consolidation and reconsolidation.

Rozprawa na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o
zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: Prof. dr. hab. Elżbieta Salińska

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022

Streszczenie

Wykazano, że każdy proces uczenia uruchamia wewnątrzkomórkową kaskadę reakcji prowadzącą do uformowania pamięci, związanej z pobraniem informacji, w procesie nazwanym konsolidacją pamięci. Wykazano też, że reaktywacja pamięci w niedługim okresie po jej konsolidacji inicjuje kolejny cykl wewnątrzkomórkowych procesów zwany rekonsolidacją pamięci. Ingerencja w te procesy poprzez hamowanie jednego z etapów wewnątrzkomórkowej kaskady reakcji, może powodować zaburzenia w zapamiętywaniu lub niemożność przypomnienia zapamiętanej informacji. W procesie zapamiętywania ważną rolę odgrywa napływ jonów wapnia (Ca^{2+}) do neuronów. Sygnał wapniowy uruchamia kaskadę reakcji wewnątrzkomórkowych prowadzących do zapisania informacji w formie śladu pamięciowego. Ważnymi drogami napływu Ca^{2+} są kanały wapniowe związane z jonotropowymi receptorami glutaminianu (NMDA, AMPA), ale poziom Ca^{2+} w komórkach wzrasta także po aktywacji metabotropowych receptorów glutaminianu grupy I (mGluR1/5), które pośredniczą w uwalnianiu Ca^{2+} z magazynów zlokalizowanych w siateczce śródplazmatycznej. Ostatnie badania wskazują na dodatkowy mechanizm zaangażowany w napływ i podwyższanie poziomu Ca^{2+} w neuronach, uruchamiany nie sygnałem z wnętrza komórki, a będącym pośrednio wynikiem aktywacji metabotropowych receptorów glutaminianu - mGluR grupy I. Mowa tu o kanałach jonowych zwanych transient receptor potential channels (TRP), które są przepuszczalne dla jonów Na^+ , K^+ , Mg^{2+} a przede wszystkim dla Ca^{2+} . Kanały te aktywowane są wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} uwalnianego z magazynów w siateczce śródplazmatycznej po aktywacji receptorów IP3 (Rebordea i wsp., 2011). Na podstawie dotychczasowych doniesień można przypuszczać, że napływ Ca^{2+} przez kanały TRP może być ważną częścią procesu zapamiętywania.

Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy zablokowanie napływu Ca^{2+} przez kanały TRP może spowodować upośledzenie procesu zapamiętywania w stosowanym przez nas modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt, oraz czy będzie miało wpływ na ekspresję białek zaangażowanych w formowanie pamięci.

Pierwszym etapem badań było potwierdzenie obecności kanałów TRP w mózgu kurczęcia, zwłaszcza w rejonach związanych z formowaniem pamięci. Przy użyciu specyficznych przeciwciał zbadano ekspresję kanałów TRPV1, TRPV3 oraz TRPC3 w

skrawkach mózgu kurcząt metodą Western Blot jak również metodą immunocytochemiczną. Badanie wykazało obecność wszystkich tych kanałów w mózgu kurcząt.

W badaniach behawioralnych wykorzystano naturalny odruch dziobania występujący u kurcząt. Kurczętom prezentowano sztuczne ziarenko umieszczone na druciku i powleczone gorzko smakującą substancją (antranilat metylu; MeA) wywołującą ostrą reakcję absmakową. Zwierzęta zapamiętują gorzki smak na co najmniej 48 godzin i unikają dziobania prezentowanego ziarenka. Pamięć testowana była w określonych czasach po treningu lub przypomnieniu, poprzez ponowną prezentację metalowego ziarenka. Wyniki testów przedstawiane są jako procent zwierząt unikających podczas testu dziobania ziarna identycznego z pokrytym MeA, w stosunku do całkowitej liczby zwierząt w danej grupie badawczej.

W badaniach stosowano niespecyficzne inhibitory kanałów TRP – SKF 96365 oraz 2-APB. Związki te podawano bezpośrednio do mózgu w rejon wiązany z tworzeniem pamięci u kurcząt (IMM) poprzez iniekcję z użyciem specjalnie przygotowanej strzykawki umożliwiającej wprowadzenie igły na określoną głębokość, a miejsce iniekcji rozpoznawano kierując się charakterystycznymi cechami budowy nieskostniałej czaszki kurcząt.

W pierwszych badaniach określono optymalną dawkę inhibitorów kanałów TRP oraz czas podania skutkujący najbardziej nasiloną amnezją. Wykazano, że podanie niespecyficznych inhibitorów kanałów TRP natychmiast po treningu lub po przypomnieniu, mającym miejsce 2 godziny po treningu, (prezentacja identycznego co przy treningu ziarna, ale o smaku obojętnym), wywołuje efekt amnezji utrzymujący się przez 24 godziny, czyli do końca eksperymentu. Tym samym stwierdzono, że zablokowanie kanałów TRP na wczesnym etapie formowania pamięci powoduje zaburzenie konsolidacji. Zauważono, że podanie inhibitorów kanałów TRP zarówno po przypomnieniu jak i 2 godziny po treningu, bez uprzedniego przypominania, powodowało amnezję w obu przypadkach. Wskazuje to, że możemy mieć tu do czynienia z raczej zaburzeniem procesu przypominania, a nie rekonsolidacji pamięci.

Zbadano również efekt specyficznego zablokowania kanałów TRPV1, TRPV3 oraz TRPC3 wywołanego podaniem przeciwciał właściwych dla danych kanałów. Przeciwciała podawano bezpośrednio po treningu lub przypomnieniu, a kurczęta testowano 2 lub 24 godziny później. Wykazano, że zablokowanie każdego z tych kanałów skutkowało amnezją

obserwowaną w wybranych czasach testu, co wskazuje na bezpośrednie zaangażowanie kanałów TRPV1, TRPV3 oraz TRPC3 w procesy zapamiętywania.

Istotne znaczenie sygnału wapniowego pochodzącego z aktywacji kanałów TRP w procesach zapamiętywania wykazano w doświadczeniach, w których blokowano sygnał wapniowy pochodzący z aktywacji mGluR1 lub mGluR5. Zablokowanie tych sygnałów wapniowych skutkowało znaczną amnezją, jednak równoczesne pobudzenie kanałów TRP i umożliwienie napływu Ca^{2+} tą drogą, znosiło efekt amnezji. Wskazuje to na istotną rolę sygnału wapniowego z kanałów TRP i prawdopodobną posiłkową rolę mGluR1/5.

Następnym etapem badań było sprawdzenie czy zablokowanie kanałów TRP miało wpływ na poziom ekspresji wybranych białek związanych z formowaniem pamięci (CaMKII, NCAM). Ekspresję CaMKII oraz NCAM mierzono na poziomie białek metodą Western Blot oraz na poziomie mRNA przy użyciu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR). Badania prowadzono na próbkach uzyskanej tkanki mózgowej kurcząt zawierających rejon IMM izolowanych godzinę (pomiar mRNA) lub dwie godziny (pomiar białka) po treningu lub po przypomnieniu.

Przeprowadzone badania wykazały istotny statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej wzrost ekspresji białek NCAM i CaMKII zarówno po treningu jak i po przypomnieniu. Podanie SKF 96365 bezpośrednio po treningu lub po przypomnieniu zahamowało ten wzrost i spowodowało utrzymanie ekspresji obu białek na poziomie porównywalnym do kontroli. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach ekspresji mRNA dla NCAM oraz dla CaMKII zarówno po treningu jak i przypomnieniu w porównaniu do grup kontrolnych, również w grupach, którym podano SKF 96365. Sugeruje to, że zmiany ekspresji badanych białek, związane z formowaniem pamięci w tym modelu doświadczalnym, mogą zachodzić głównie na poziomie translacji, a nie transkrypcji.

Przedstawione wyniki wskazują na istotne zaangażowanie kanałów TRP w procesie formowania pamięci zarówno na etapie początkowym, związanym z utrwalaniem pamięci, jakim jest konsolidacja, jak i w procesach związanych z przywołaniem nabytej informacji. Wyniki wskazują również, że aktywacja kanałów TRP i napływ przez nie Ca^{2+} do komórki jest ważnym elementem wewnątrzkomórkowej kaskady prowadzącej do syntezy białek niezbędnych do zapisania informacji, a zablokowanie tych kanałów wiąże się z zaburzeniami ekspresji tych białek oraz amnezją.

Na podstawie przedstawionych w tej pracy wyników można stwierdzić, że zaangażowanie kanałów TRP w procesy pamięciowe jest bardziej kluczowe i odgrywa ważniejszą rolę niż uważano do tej pory.

