



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

Badania, których wyniki przedstawiono w rozprawie, były finansowane
w ramach grantu numer NCN 2014/15/B/NZ4/04487

Wykaz publikacji autora:

- 1. Krolik A**, Diamandakis D, Zych A, Stafiej A, Salinska E. The involvement of TRP channels in memory formation and task retrieval in a passive avoidance task in one-day old chicks. *Neurobiol Learn Mem.* 2020 May
- 2.** Szymusik I, Kosinska-Kaczynska K, **Krolik A**, Skurnowicz M, Pietrzak B, Wielgos M. The usefulness of the universal culture-based screening and the efficacy of intrapartum prophylaxis of group B Streptococcus infection. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014 Jun;27(9):968-70.

Wykaz ważniejszych skrótów

2-APB - boran 2-aminoetoksydifenylu

AMPA - kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksalopropionowy

CaMKII - kinaza białkowa zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny II

CICR - wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} wywołany zależnym od wapnia uwalnianiem tych jonów (z ang. calcium induced calcium release)

DAG – diacyloglicerol

DHPG - 3,5-dihydroksyfenyloglicyna

ER – retikulum endoplazmatyczne

IMM – pośrednie i środkowe mezopallium (z ang. intermediate medial mesopallium; dawniej

IMHV - pośrednie i środkowe nadprążkowie centralne (z ang. intermediate medial hyperstriatum centrale)

IP3 – 1,4,5-trisfosforan inozytolu

KA - kwas kainowy

LTD - długotrwałe osłabienie synaptyczne (z ang. long term depression)

LTM – pamięć długotrwała (z ang. long term memory)

LTP - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (z ang. long term potentiation)

LY 367385 – (S) - (+) - kwas α -amino-4-karboksy-2-metylobenzenoocowy

MeA – antranilat metylu

mGluR –metabotropowe receptory glutaminianergiczne

MPEP - 2-metylo-6-(fenyloetylo)-pirydyna

NCAM - neuralna cząsteczka adhezji komórkowej (z ang. neural cell adhesion molecule)

NCX – wymiennik sodowo wapniowy

NMDA - N-metylo-D-asparaginian

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PFA – paraformaldehyd

PIP2 – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan

PKC - kinaza białkowa C

PLC - fosfolipaza C

PMCA - plazmatyczna Ca^{2+} ATP-aza (z ang. plasma membrane calcium ATPase)

qPCR - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

RT – odwrotna transkrypcja

SERCA - sarko(endo)plazmatyczna Ca²⁺-ATPaza

SKF-96365 - 1-[2-(4-Metoksyfenyl)-2-[3-(4-metoksyfenyl)propoksy]etyl]imidazol

SOCE - napływ jonów wapnia do komórki sterowany pojemnościowo (z ang. store-operated calcium entry)

STM - pamięć krótkotrwała (z ang. short term memory)

TRP – receptory przejściowego potencjału (z ang. transient receptor potential)

VGCC - kanały Ca²⁺ zależne od potencjału błonowego (z ang. voltage gated calcium channel)

Spis treści

1. Wstęp.....	14
1.1. Czym jest pamięć?.....	15
1.2. Konsolidacja i rekonsolidacja pamięci.....	17
1.3. Molekularne mechanizmy.....	19
1.4. Rodzaje oraz znaczenie jonowych kanałów TRP.....	22
1.4.1. TRPC.....	26
1.4.2. TRPV.....	27
1.5. Modulatory kanałów TRP.....	28
1.5.1. Syntetyczne modulatory kanałów TRP.....	28
1.5.1.1. SKF-96365.....	29
1.5.1.2. 2-APB.....	29
1.6. Białka związane z procesami formowania się pamięci.....	29
1.6.1. Neuralna cząsteczka adhezji komórkowej.....	30
1.6.2. II Kinaza zależna od kalmoduliny.....	31
1.7. Model pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych.....	33
1.8. Znaczenie projektu.....	33
2. Założenia i cele pracy.....	35
3. Materiały i metody.....	36
3.1. Model pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt.....	36
3.2. Grupy doświadczalne i podawanie badanych związków.....	37
3.3. Ocena obecności kanałów TRP w mózgu kurcząt metodą immunohistochemii fluorescencyjnej.....	39
3.4. Ocena ekspresji białek w mózgu kurcząt.....	39
3.5. Ocena ekspresji białek na poziomie mRNA.....	41
3.5.1. Izolacja RNA.....	41

3.5.2. Odwrotna transkrypcja (RT).....	41
3.5.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).....	41
3.5.4. Analiza statystyczna.....	43
4. Wyniki.....	45
4.1. Potwierdzenie obecności kanałów TRP w rejonie IMM mózgu kurcząt.....	45
4.2. Dobór dawki oraz czasu iniekcji SKF96365.....	45
4.3. Wpływ zablokowania kanałów TRP na konsolidację i rekonsolidację pamięci.....	47
4.4 Wykazanie kluczowej roli aktywacji kanałów TRP w procesie formowania pamięci.....	53
4.5. Wpływ SKF96365 na wywołane treningiem i przypomnieniem zmiany ekspresji wybranych białek związanych z procesami zapamiętywania i ich mRNA.....	58
5. Dyskusja.....	60
5.1 Kurczęta jako model zwierzęcy.....	60
5.2 Obecność kanałów TRP w mózgu kurcząt.....	62
5.3 Wpływ blokowania kanałów TRP na procesy formowania pamięci.....	63
5.4 Ekspresja białek oraz mRNA NCAM i CaMKII.....	67
6. Podsumowanie.....	72
7. Bibliografia.....	73

Streszczenie

Zostało wykazane, 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 tkance

mózgu kurcząt metodą Western Blot oraz metodą immunocytochemiczną na skrawkach mózgu. 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 zablokowano 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 mózgu 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.

Abstract

It has been proven that each learning process initiates an intracellular cascade of reactions leading to the memory formation connected with information retrieval in the process called memory consolidation. It has also been shown that reactivation of memory in the short time after its consolidation initiates another intracellular cycle of processes called memory reconsolidation. Interference with those processes by inhibition of one of the steps of the intracellular cascade of reactions may lead to disturbances in learning or the inability to retrieve previously remembered information. In the process of memory formation important role is played by the influx of calcium ions (Ca^{2+}) to neurons. Calcium signal initiates the cascade of intracellular reactions which leads to saving information in the form of a memory trace. Calcium channels coupled to ionotropic glutamate receptors (NMDA and AMPA) are the important ways of Ca^{2+} influx to the neurons; however, the level of Ca^{2+} in the neurons increases also after activation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1/5), which mediate the release of calcium ions from intracellular magazines in the endoplasmic reticulum.

Recent research indicates an additional mechanism involved in calcium influx increasing Ca^{2+} levels in neurons, not initiated by the external signal, but the one coming from the inside of the cell and being indirectly a result of activation of glutamate receptors – mGluR group I. The signal is coming from the ion channels called transient receptor potential channels (TRP), which are permeable to Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ions but mostly to Ca^{2+} . Those channels are activated by the increase of intracellular Ca^{2+} resulting from the release from the stores located in the endoplasmic reticulum after IP3 receptor activation (Reboreda i wsp., 2011).

Based on the currently available information it can be assumed that Ca^{2+} influx through TRP channels can be an important part of the process of memory formation. The aim of this research was the investigation whether the blockage of Ca^{2+} influx through TRP channels can cause the impairment of the process of memory formation in the model of passive avoidance task in one-day old chick and whether it can influence the expression of proteins involved in the memory formation.

The first step in our research was confirmation of the presence of TRP channels in the chick's brain, especially in the regions involved in memory formation. With the use of specific antibodies the expression of the TRPV1, TRPV3, and TRPC3 channels in the brain tissue slices

was investigated using the Western Blot and immunocytochemistry methods. The results confirmed the presence of all investigated channels.

In the behavioral studies, the natural pecking reaction of chicks was used. Chicks were presented with an artificial bead at the tip of the thin metal stick that was covered with a bitter-tasting substance called methyl anthranilate (MeA). Pecking bitter bead creates a typical disgust reaction. Animals remember the bitter taste for at least 48 hours and avoid pecking. Memory was tested in the specific times after training or reminder by presenting chicks with the bead again. The results of testing are shown as the percent of animals avoiding pecking bead identical to the one covered in MeA during the test to the total number of animals in each group tested.

In the presented studies non-specific inhibitors of TRP channels – SKF 96365 and 2-APB were used. These substances were injected directly into the brain region responsible for chick memory formation (IMM) using a specially prepared syringe that enabled the insertion of the needle at a specific depth and the place of injection was determined by the specific structure of the not-fully ossified skull.

Firstly the optimal dose of TRP channel inhibitors resulting in the strongest amnesia was determined. It was also shown that injection of non-specific TRP channels inhibitors immediately after training or reminder taking place 2 hours after training (presentation of the identical to the training bead but of neutral taste) results in the amnesia that lasted for 24 hours. That leads to the conclusion, that blockage of TRP channels leads to disturbance of both memory and reconsolidation. However, injection of inhibitors 2 hours after the training without the previous reminder also resulted in amnesia. This suggests that in this case, we can deal with rather a disturbance of the reminder process and not memory reconsolidation.

The effect of specific blockage of TRPV1, TRPV3, and TRPC3 channels caused by the brain injection of antibodies specific to each of those channels was investigated as well. Antibodies were injected immediately after the training or reminder and chicks were tested 2 or 24 hours later. It was shown that the blockage of each of the investigated channels resulted in amnesia observed in the times of tests which points to the direct engagement of TRPV1, TRPV3 and TRPC3 channels in the processes of memory formation.

The importance of the calcium signal coming from the activation of TRP channels in memory formation was shown in experiments in which the calcium signal derived from activation of mGluR1 or mGluR5 was inhibited. Inhibition of this signal resulted in significant

amnesia; however, simultaneous activation of TRP channels and enabling of calcium influx this way abolished the effect of amnesia. These results indicate an important role of calcium signal generated by TRP channels activation and probable auxiliary role of mGluR1/5.

The next step of the research was to investigate whether blockage of TRP channels affects the expression of chosen proteins involved in memory formation (CaMKII, NCAM). The expression was measured at the protein level using the Western Blot method and at the mRNA level using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Studies were conducted on the chicken brain samples containing IMM region isolated from the left and right hemisphere one hour (mRNA measurement) or two hours (protein measurement) after training or reminder. Conducted studies have shown a statistically significant, compared to the control group, increase in expression of NCAM and CaMKII both after training and reminder. NCAM and CaMKII expression observed after the reminder was lower than the one observed after training however did not differ significantly. Injection of SKF 96365 immediately after training or reminder resulted in the steady expression of both proteins, comparable to the control levels. No statistically significant differences in the levels of expression of mRNA for NCAM and CaMKII were shown, both after training and reminder compared to the control groups, also in the groups that were given SKF 96365. This suggests that changes in the expression of studied proteins involved in memory formation in this research model may occur mainly at the translation and not transcription level.

Presented results point to the significant involvement of TRP channels in the processes of memory formation both at the initial steps, in the processes connected with preserving of memory which is consolidation, and processes connected with recalling of already gained information. However, based on the presented results it is difficult to unambiguously state whether studied TRP channels are involved also in memory reconsolidation. Obtained results point as well to the fact that TRP channels activation is a part of intracellular cascade leading to the synthesis of proteins necessary to store information and the blockage of those channels is connected with disturbances in expression of those proteins as well results in amnesia.

Based on the results presented in this dissertation it can be stated, that engagement of TRP channels in the memory processes is more crucial and plays a much more important role than has been thought before.

Innowacyjność rozprawy

Procesy związane z formowaniem i utrwalaniem pamięci, podobnie jak te związane z przypominaniem wcześniej przyswojonych informacji, nadal stanowią przedmiot szerokich badań. Do tej pory nie uzyskano odpowiedzi na wszystkie pytania związane z komórkowymi mechanizmami zaangażowanymi w tworzenie pamięci. Badania przedstawione w niniejszej dysertacji miały na celu scharakteryzowanie udziału kanałów TRP w procesach konsolidacji i rekonsolidacji pamięci w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt. Badania te miały również wykazać jak bardzo sygnał wapniowy generowany aktywacją kanałów TRP jest ważny dla uruchomienia wewnątrzkomórkowej kaskady reakcji prowadzących do utrwalenia informacji.

Wykazano po raz pierwszy, że:

- Zablockowanie kanałów TRP niespecyficznym inhibitorem SKF 96365 jak również specyficzne zablokowanie wybranych kanałów (TRPV1, TRPV3 oraz zTRPC3) skutkuje zaburzeniem konsolidacji pamięci oraz zablokowaniem procesu przypominania
- Zablockowanie sygnału wapniowego kanałów TRP niespecyficznym inhibitorem skutkuje zaburzeniami ekspresji wybranych białek (CaMKII oraz NCAM) zaangażowanych w procesy zapamiętywania na poziomie transkrypcji, co na pewno miało udział w obserwowanych amnezjach.
- Sygnał wapniowy generowany aktywacją kanałów TRP ma większe znaczenie w uruchomieniu reakcji formowania pamięci niż sygnał wapniowy generowany na drodze pobudzenia metabotropowych receptorów glutaminianu grupy I (mGluR1/5), który wydaje się mieć znaczenie posiłkowe.

1. WSTĘP

Zrozumienie istoty procesów tworzenia i magazynowania pamięci stanowi od wielu lat jedno z głównych wyzwań w badaniach nad mózgiem. Pamięć definiuje naszą osobowość, a zatem decyduje o naszym człowieczeństwie. Ostatnie lata to wielki rozwój badań mózgu, w tym i badań nad procesami uczenia się i pamięci, związanymi z życiem każdego zwierzęcia, również człowieka. Mimo powszechności tych procesów, ich mechanizm oraz molekularne podstawy nie zostały jeszcze wystarczająco poznane. W celu ich zrozumienia opracowanych zostało wiele modeli badawczych, a doświadczenia prowadzono na różnych gatunkach zwierząt, począwszy od robaków i owadów, poprzez mięczaki, skorupiaki, ryby, ptaki, na ssakach kończąc. Do połowy lat osiemdziesiątych w badaniach nad mechanizmami zapamiętywania dominowały podejścia elektrofizjologiczne, neuroanatomiczne, behawioralne i neurochemiczne. W ostatnich latach do badań włączono także biologię molekularną, rozumianą, jako dziedzinę pozwalającą śledzić przekazywanie informacji wewnątrz komórki - odbieranie jej ze środowiska zewnętrznego, generowanie sygnału przenoszonego do wnętrza neuronów i uruchamianie reakcji prowadzących do zapisywania tej informacji w pamięci poprzez uruchamianie specyficznych genów i ich produktów.

W tej pracy do badań nad mechanizmami tworzenia i zaburzeń pamięci zastosowano model opracowany dla jednodniowych kurcząt, w którym wykorzystuje się zdolność tych zwierząt do zapamiętywania nieprzyjemnych bodźców smakowych i unikania ich w przyszłości. W badaniach wykorzystano metody behawioralne, biochemiczne, oraz metody biologii molekularnej.

Trenowanie kurcząt w ramach zadań unikania negatywnych bodźców smakowych skutkuje molekularną kaskadą w określonym rejonie mózgu kurczęcia – pośrednio przyśrodkowym nadprążkowie brzusznej (z ang. intermediate medial mesopallium - IMM). Kaskada ta jest zainicjowana poprzez uwolnienie glutaminianu i angażuje serie synaptycznych wydarzeń, takich jak aktywację glutaminianowych receptorów jonotropowych - N-metylo-D-asparagianu (NMDA), zwiększony napływ jonów wapnia do komórki, fosforylację białek enzymatycznych i uruchamianie syntezy nowych białek.

Wykazano, że podczas treningu oraz 5 minut po nim następuje zwiększone uwalnianie glutaminianu w rejonie IMM, co wykazano zarówno przy wykorzystaniu mikrodializy *in vivo* (Daisley i wsp., 1998), jak również analizy skrawków mózgu tego rejonu (Daisley i Rose, 1994).

Zaobserwowano także wzrost aktywności zależnych od potencjału oraz związanych z receptorami glutaminianu kanałów wapniowych w synaptoneurosomach wyizolowanych po treningu z rejonu IMM mózgu kurcząt (Salinska i wsp., 1999).

Badania z wykorzystaniem 2-deoksyglukozy wykazały dwa rejony kurczącego przodomózgowia wykazujące zwiększoną aktywność metaboliczną w okresie 40 minut po treningu (Kossut i Rose, 1984). Rejonami tymi są poprzednio wspomniany IMM – ‘korowy’ rejon zaangażowany w wdrukowanie (imprinting) wrażeń wzrokowych i smakowych (Horn, 1985) oraz płat przywęchowy (lobus paraolfactorius) – homolog jąder podstawnych (Csillag, 1999, Rose, 2000). Kurczący mózg jest mocno zlateralizowany (Andrew i wsp., 2004) i znaczna część obserwowanych w krótkim czasie po treningu zmian molekularnych miała miejsce w IMM lewej półkuli mózgu, podobne zmiany manifestowały się w prawej półkuli po upływie kilkunastu do kilkudziesięciu minut (Sandi i wsp., 1993).

1.1. Czym jest pamięć?

W uproszczeniu pamięć można określić jako zdolność przechowywania w ośrodkowym układzie nerwowym informacji o świecie w formie tzw. śladów pamięciowych – ‘engramów’. Pojęcie to określa trwałą zmianę zachodzącą w mózgu, wywołaną przez chwilowe pobudzenie i odczytywaną jako reprezentacja doznań, przeżyć, elementów środowiska wewnętrznego i zewnętrznego (Semon, 2016).

Konwencjonalna taksonomia rodzajów pamięci rozróżnia pamięć deklaratywną, która jest pamięcią faktów (semantyczną) lub wydarzeń (epizodyczną) i która wymaga wyraźnej świadomości dla przywołania informacji oraz pamięć niedeklaratywną – kolekcję pamięciową nabytych umiejętności, których użycie nie wymaga świadomego przywołania (Squire, 2004).

W związku z rozciągnięciem w czasie procesów związanych z zapisywaniem w mózgu informacji, od lat funkcjonują pojęcia pamięci krótkotrwałej oraz długotrwałej (z ang. Short term memory, STM; Long term memory, LTM). Pamięć krótkotrwała tworzona jest w ciągu minut i kilku godzin od momentu pozyskania informacji lub rozpoczęcia procesu uczenia się (treningu). Bazuje ona na przejściowych modyfikacjach wcześniej istniejących białek, głównie na fosforylacji i defosforylacji enzymów, aktywacji receptorów lub kanałów jonowych, mogących momentalnie zmieniać wydajność przekaźnictwa synaptycznego.

Pamięć długotrwała stanowi magazyn zakodowanych śladów pamięciowych, o nieograniczonej pojemności i czasie przechowywania. Pamięć ta jest zależna od syntezy nowych białek (Davis i Squire, 1984) i związana jest z plastycznością synaps czyli zdolnością do zmian strukturalnych istniejących już połączeń synaptycznych oraz wytwarzania nowych (Bailey i Kandel, 1993; Moser i wsp., 1994; Stork i Welzl, 1999). Pamięć długotrwała może utrzymywać się godziny, dni, tygodnie, a nawet lata po seansie uczenia (Battaglia i wsp., 2001).

Badania wykazały, że w pierwszych stadiach tworzenia zapisu pamięciowego bierze udział hipokamp, (Scoville i Milner, 1957; Squire, 2004; Squire i wsp., 2001). Wykazano również, że pewne obszary kory nowej mózgu są zaangażowane w formowanie się pamięci w fazie jej kodowania i przechodzenia w stan stabilny (Barker i Warburton, 2008; Paz i wsp., 2007).

Początkowe badania pacjentów po uszkodzeniu pośrodkowego płatu skroniowego, wykazywały upośledzenie ich pamięci długotrwałej oraz prawidłową funkcję pamięci krótkotrwałej (Baddeley i wsp., 2003; Drachman i Arbit, 1966; Milner, 1972; Squire, 1992), jednak z czasem pogląd ten zrewidowano po wykazaniu u pacjentów z amnezją hipokampalną upośledzonej zdolności zapamiętywania umiejscowienia nowych obiektów, nawet w kilkusekundowych interwałach czasowych (Jonides i wsp., 2008) i zasugerowano, że oprócz uznanej roli hipokampa w konsolidacji śladów pamięciowych z pamięci krótkotrwałej do długotrwałej, bierze on udział również w niektórych formach pamięci operacyjnej (Graham i wsp., 2010; Ranganath i Blumenfeld, 2005).

Wykazano, że jądro migdałowe zaangażowane jest nie tylko w modulację pamięci długotrwałej (Bianchin i wsp., 1999), ale również w przechowywanie długotrwałych śladów pamięciowych, w szczególności odnoszących się do strachu i w efekcie bierze udział w genezie zespołu stresu pourazowego (Morey i wsp., 2012). Pamięć długotrwała zaś, w zależności od typu wymaga udziału takich struktur mózgu jak kora granicząca z hipokampem, struktury korowe i podkorowe, obwody pośrodkowego płatu skroniowego oraz hipokampa, jądra podstawne oraz mózdzek.

Przechodzenie z STM do LTM wymaga plastyczności synaptycznej (a zwłaszcza zależnej od aktywności plastyczności synaptycznej w obrębie hipokampa) (Bliss i Collingridge, 1993; Eichenbaum, 2000; Martin i wsp., 2000; Morris i wsp., 1982). Jest ona zależna od uruchomienia wewnątrzkomórkowych molekularnych kaskad sygnałowych, których efektem jest

wzmocnienie odpowiednich połączeń synaptycznych utrwalających informacje w sieci mózgowej (Mayford i wsp., 2012).

1.2. Konsolidacja i rekonsolidacja pamięci

Przeprowadzenie początkowo niestabilnej pamięci krótkotrwałej do stabilnej pamięci długotrwałej w wyniku wewnątrzkomórkowych molekularnych przemian prowadzących do trwałych zmian w połączeniach synaptycznych nazwana jest konsolidacją pamięci. Termin „konsolidacja”, z łacińskiego „stać się trwałym”, przypisywany jest Müllerowi i Pilzeckerowi (Müller i Pilzecker, 1900). Konsolidacja pamięci jest zapisaniem śladu pamięciowego po pierwszym zarejestrowaniu informacji. Składa się z dwóch odrębnych procesów – konsolidacji synaptycznej i konsolidacji systemowej.

Konsolidacja synaptyczna wymaga uruchomienia szlaków łączących procesy zachodzące w synapsach z tymi, zachodzącymi w ciele i jądrze komórki. Obejmuje ona aktywację wewnątrzkomórkowych reakcji, skutkujących modulowaniem ekspresji genów, syntezę białek wraz z potranslacyjnymi modyfikacjami, które wpływają na wydajność synaps. Uważa się, że konsolidacja synaptyczna trwa do kilku godzin od jej rozpoczęcia, a po zakończeniu staje się odporna na działanie czynników, które mogą zapobiegać konwersji pamięci w formę długotrwałą („czynniki amnezyjne”), pośród których wyróżniamy bodźce rozpraszające oraz farmakologiczne czynniki. Synaptyczna konsolidacja występuje w całym królestwie zwierząt.

Systemowa konsolidacja pamięci odnosi się do zależnej od czasu reorganizacji reprezentacji pamięci długotrwałej (LTM) w obwodach neuralnych mózgu (Bolhuis, 2000). Jest ona procesem trwającym tygodnie, miesiące a nawet lata, zależnie od systemu pamięci oraz zadania.

Tse i współpracownicy (2011) wykazali, że początkowe etapy formowania pamięci związane są z aktywacją, w ciągu minut do godzin, genów wczesnej odpowiedzi komórkowej kory przedczołowej, a farmakologiczne interwencje, mogą zapobiegać zarówno konsolidacji nowych informacji jak również przywoływananiu z pamięci informacji skonsolidowanych zarówno niedawno jak i w czasie wcześniejszym.

Tradycyjna hipoteza konsolidacji pamięci zakładała, że dla każdego elementu w LTM, konsolidacja zaczyna się i kończy jedynie raz (Dudai, 2004). Wykazano, że po konsolidacji

pamięć jest odporna na czynniki wywołujące amnezję, takie jak np. elektroshok czy czynniki chemiczne blokujące łańcuch wewnątrzkomórkowych reakcji związanych z formowaniem pamięci. Mogą to być związki blokujące receptory neuroprzekaźników, blokujące aktywację enzymów oraz hamujące transkrypcje genów czy syntezę białek.

Ten pogląd został zakwestionowany w późnych latach sześćdziesiątych, bazując na doniesieniach wskazujących, że prezentacja „sygnału przypominającego”, powodująca sięgnięcie do wcześniej zapisanych informacji, czyni pamięć, wydającą się być skonsolidowaną, ponownie wrażliwą na „czynniki amnezyczne” (Misanin i wsp., 1968). Stabilna wcześniej pamięć, po przypomnieniu przechodzi ponownie fazę, w której staje się niestabilna i jest wrażliwa na czynniki zaburzające formowanie pamięci na początkowym etapie. Przypomnienie uruchamia bowiem szlak wewnątrzkomórkowych reakcji ponownie zapisujących i weryfikujących wcześniej utwaloną informację. To indukowane reaktywacją ponowne otwarcie okna podobnego do konsolidacji nazwane zostało ‘rekonsolidacją’ (Alberini, 2011; Dudai, 2004; Nader i wsp., 2000; Sara, 2000).

Proces ten jest podobny, ale nie identyczny z konsolidacją (Crowe i wsp., 2008; Nader i Hardt, 2009). Pamięć po przypomnieniu staje się ponownie wrażliwa na różne bodźce, zarówno zewnętrzne jak i wewnętrzne, które mogą zaburzyć jej ponowne zapisanie. Ingerencja w te procesy, poprzez hamowanie jednego z etapów wewnątrzkomórkowej kaskady reakcji, może spowodować zaburzenia w zapamiętywaniu lub niemożność przypomnienia zapamiętanej informacji. Wykazano, że wśród czynników zaburzających rekonsolidację znajdują się antagoniści receptorów glutaminianu oraz inhibitory syntezy białek (Alberini, 2011; Dennis i Perrotti, 2015; Diergaarde i wsp., 2008; Gieros i wsp., 2012; Krolik i wsp., 2020; Rose, 2000). Jednakże w odróżnieniu od początkowego treningu, gdzie te czynniki powodowały trwałą amnezję, obserwowana amnezja była jedynie czasowa (Krolik i wsp., 2020; Riccio i wsp., 2002). Rekonsolidacja wydaje się nie zachodzić za każdym razem, kiedy zapamiętana informacja jest przywoływana. Jej wystąpienie wydaje się być bardziej prawdopodobne, kiedy reaktywowany ślad pamięciowy jest świeży lub silnie zapisany (Dudai, 2012, 2004). Te odkrycia stoją w zgodności z hipotezą, że w prawdziwych warunkach życiowych, rekonsolidacja może stanowić szansę aktualizacji ważnych informacji lub umiejętności.

Procesy związane z formowaniem pamięci są wciąż obiektem badań i do tej pory nie uzyskano ich pełnego obrazu. Konsolidacja i rekonsolidacja pamięci są stale obiektem badań

oraz zmiany sposobu ich postrzegania. Ostatnio wprowadzono pojęcie integracji pamięci dla opisanego procesu zapamiętywania jako całości, jednak nadal zawiera ono w sobie oba wcześniej używane terminy (Gisquet-Verrier, 2018).

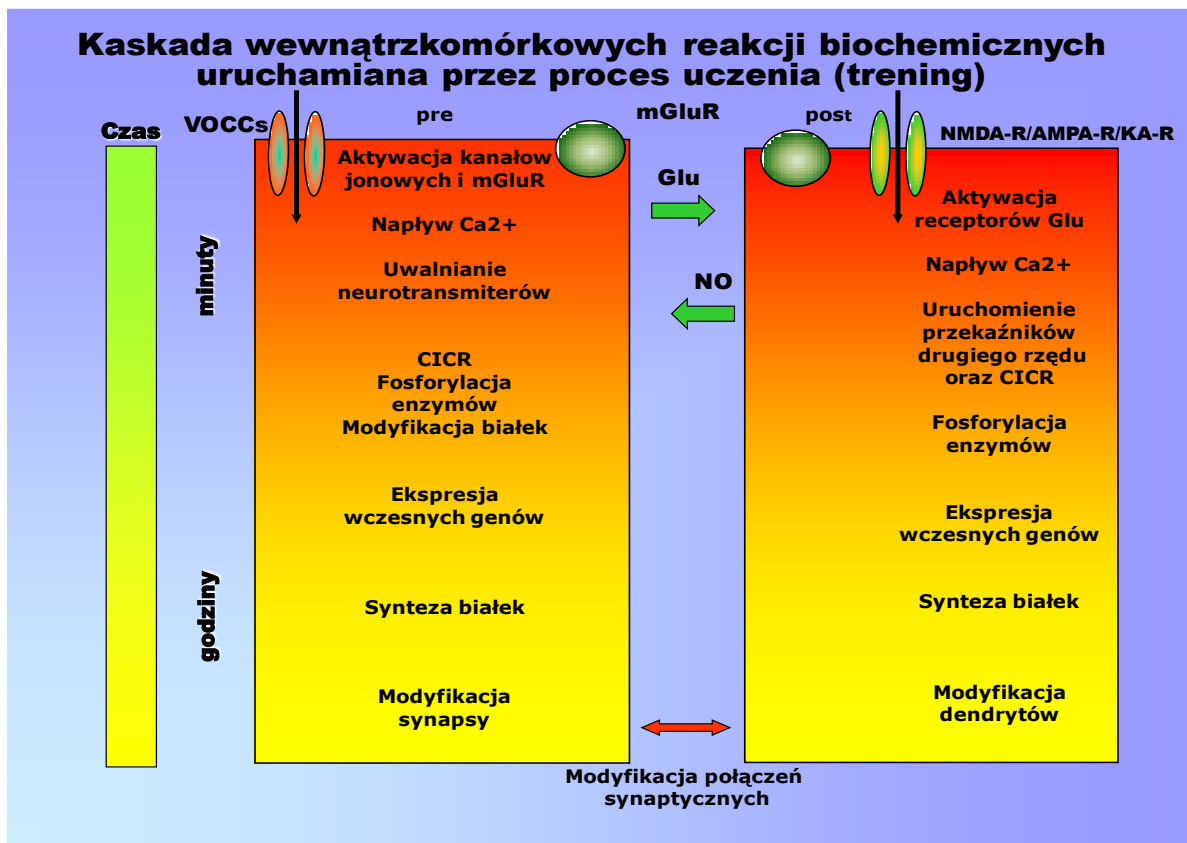
1.3. Molekularne mechanizmy

Pytanie o naturę pamięci sprowadza się do zrozumienia molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za modyfikacje siły połączeń synaptycznych. Pamięć krótkotrwała bazuje na przejściowych modyfikacjach już istniejących molekuł (enzymów, receptorów, kanałów jonowych), które zmieniają intensywność transmisji synaptycznej. Tworzenie pamięci długotrwałej związane jest z syntezą nowych białek i modyfikacji już istniejących oraz zmianami w połączeniach synaptycznych. Molekularne mechanizmy procesu zapamiętywania są złożoną interakcją wielu czynników i angażują skomplikowany system neuroprzekaźników. Najbardziej rozpowszechnionymi w układzie nerwowym neuroprzekaźnikami są: glutaminian, kwas gamma-aminomasłowy (GABA), dopamina, serotonina, acetylocholina oraz noradrenalina; pierwsze cztery z nich są neuroprzekaźnikami zaangażowanymi w formowanie się pamięci oraz jej modyfikacje. Na szczególną uwagę zasługuje glutaminian, pobudzający neuroprzekaźnik, uważany za główny czynnik inicjujący formowanie pamięci (Wierońska i Cieślik, 2017).

Glutaminian jest neuroprzekaźnikiem najbardziej rozpowszechnionym w ośrodkowym układzie nerwowym. Układ glutaminianergiczny charakteryzuje się największą różnorodnością budowy i funkcji receptorów spośród wszystkich układów neurotransmisyjnych w OUN. Działanie układu glutaminianergicznego opiera się na interakcji glutaminianu z dwiema odrębnymi grupami receptorów glutaminianergicznych: metabotropowych oraz jonotropowych, które są rozmieszczone we wzajemnym sąsiedztwie na błonach synaptycznych, gdzie tworzą interakcje w celu kontroli pobudzeniowej transmisji synaptycznej.

Jonotropowe receptory glutaminianu związane są z kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów Ca^{2+} , Na^+ i K^+ . W grupie tej wyróżnia się receptory N-metylo-D-asparinowe (NMDA), receptory kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA), oraz receptory kwasu kainowego (KA). Pełnią one podstawową rolę w tzw. szybkim przekaźnictwie synaptycznym.

Receptory NMDA pełnią ważną rolę w inicjowaniu molekularnej kaskady prowadzącej do zapisywania informacji. (Cao i wsp., 2007; Tsien, 2000). Wykazano, że aktywacja receptora NMDA leży u podstaw zarówno długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) jak i długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD). Aktywacja receptorów NMDA skutkuje napływem jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki i uruchomieniem wewnątrzkomórkowych reakcji zależnych od jonów Ca^{2+} . Procesy uczenia się oraz formowania pamięci zależą silnie od wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Kluczowa rola aktywacji receptorów jonotropowych dla glutaminianu (NMDA i AMPA) i otwarcia kanałów wapniowych sprzężonych z tymi receptorami, która zachodzi we wczesnych stadiach formowania się pamięci i długoterminowym utrzymaniu zmian synaptycznych jest obecnie wiedzą powszechną (Morris, 2013).



Rycina 1. Schematyczna prezentacja kaskady wewnątrzkomórkowych reakcji biochemicznych uruchamiana przez proces uczenia i zaangażowanych w proces formowania pamięci w obszarach pre- i post-synaptycznych. VOCCS – zależne od potencjału kanały jonowe; pr – część presynaptyczna; pos – część postsynaptyczna; Glu – glutaminian; NO – tlenek azotu; NMDA-R – receptor NMDA; AMPA-R – receptor AMPA; KA-R – receptor KA; ER – retikulum endoplazmatyczne, CICR – indukowane wapniem uwolnienie wapnia wewnątrzkomórkowego (z ang. calcium induced calcium release)

Do skutecznego przebiegu formowania pamięci okazał się również niezbędny dodatkowy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} wywołany zależnym od wapnia uwalnianiem tych jonów z wewnątrzkomórkowych magazynów znajdujących się w siateczce śródplazmatycznej (z ang. calcium induced calcium release, CICR). Uwalnianie tych jonów odbywa się poprzez aktywację receptorów rianodynowych znajdujących się na siateczce i wydaje się być ważny w początkowych etapach molekularnej kaskady reakcji prowadzącej do modulacji synaps niezbędnej do tworzenia pamięci długotrwałej (Salinska i wsp., 2001).

Zaangażowanie receptorów metabotropowych dla glutaminianu, zwłaszcza grupy I (mGluR1 i mGluR5) w plastyczności synaptycznej oraz procesach konsolidacji i rekonsolidacji pamięci jest również udokumentowane (Bhattacharyya, 2016; Chen i wsp., 2017; Gieros i wsp., 2012; Ménard i Quirion, 2012). mGluR1 i mGluR5 są sprzężone z białkiem G, a ich stymulacja aktywuje enzym fosfolipazę C (PLC), która katalizuje reakcje hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP2) do inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (IP3) i diacyloglicerolu (DAG). Odgrywają one ważną rolę jako wewnątrzkomórkowe przekaźniki wtórne. Aktywacja receptorów wrażliwych na IP3 w retikulum endoplazmatycznym (ER) prowadzi także do uwolnienia jonów wapnia (Ca^{2+}) z wewnątrzkomórkowych magazynów, a DAG działa jako silny aktywator PLC, która jest uważana za jedną z kluczowych kinaz kontrolujących formowanie pamięci (Bhattacharyya, 2016; Talman i wsp., 2016).

Jony wapnia, zarówno uwolnione z wewnątrzkomórkowych magazynów, jak i napływające z zewnątrz komórki, odgrywają kluczową rolę w aktywacji wewnątrzkomórkowych kaskad reakcji oraz regulacji wielu procesów komórkowych (Berridge i wsp., 2003). Są one aktywatorami szeregu enzymów, w tym kinaz białkowych i fosfataz, które działają jak przekaźniki sygnału i przekazują informację do jądra komórkowego, gdzie zapoczątkowują zmiany w transkrypcji genów aktywując czynniki transkrypcyjne. Jony wapnia mogą też dyfundować bezpośrednio do jądra komórkowego, gdzie bezpośrednio regulują enzymy i czynniki transkrypcyjne (Thiel i wsp., 2021).

Ostatnio zwrócono uwagę na rolę rodziny kanałów receptora przejściowego potencjału (z ang. TRP – transient receptor potential) w napływie Ca^{2+} do wnętrza neuronów i ich zaangażowanie w procesy formowania pamięci. Kanały TRP, umiejscowione w błonie

komórkowej, po bezpośredniej stymulacji stają się przepuszczalne dla jonów, a zwłaszcza jonów wapnia, a dodatkowym i najmocniejszym aktywatorem tego napływu jest ich aktywacja w odpowiedzi na opróżnienie wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia (Hwei Ling Ong i wsp., 2016). Ostatnie badania pokazują znaczący udział dodatkowej puli wapnia napływającego do neuronów po aktywacji tych kanałów w procesach zapamiętywania (De Clercq i Vriens, 2018; Hwei Ling Ong i wsp., 2016; Krolík i wsp., 2020; Mulier i wsp., 2017; Reboreda i wsp., 2011).

1.4. Rodzaje oraz znaczenie jonowych kanałów TRP

W roku 1969, Cosens i Manning na podstawie fenotypu behawioralnego zidentyfikowali spontanicznego mutanta muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, który podczas ekspozycji na długotrwałe intensywne światło bardzo szybko zaczynał zachowywać się tak, jakby stopniowo tracił zdolność widzenia (Cosens i Manning, 1969). Dalsze badania wykazały, że przyczyną tego zachowania jest brak funkcjonalnej kopii genu *trp* w komórkach fotoreceptorowych, który skutkuje brakiem napływu wapnia do ich wnętrza. Wykazano, że gen *trp* koduje białka kanału jonowego przepuszczalnego dla sodu i wapnia nazwanego receptorem przejściowego potencjału (z ang. TRP – transient receptor potential) (Minke, 2010; Montell i Rubin, 1989). To odkrycie doprowadziło do odkrycia pierwszych kanałów TRP u ssaków, nazwanych ‘canonical’ (TRPC) z powodu ich homologii do kanału u *Drosophila* (Wes i wsp., 1995; Zhu i wsp., 1995).

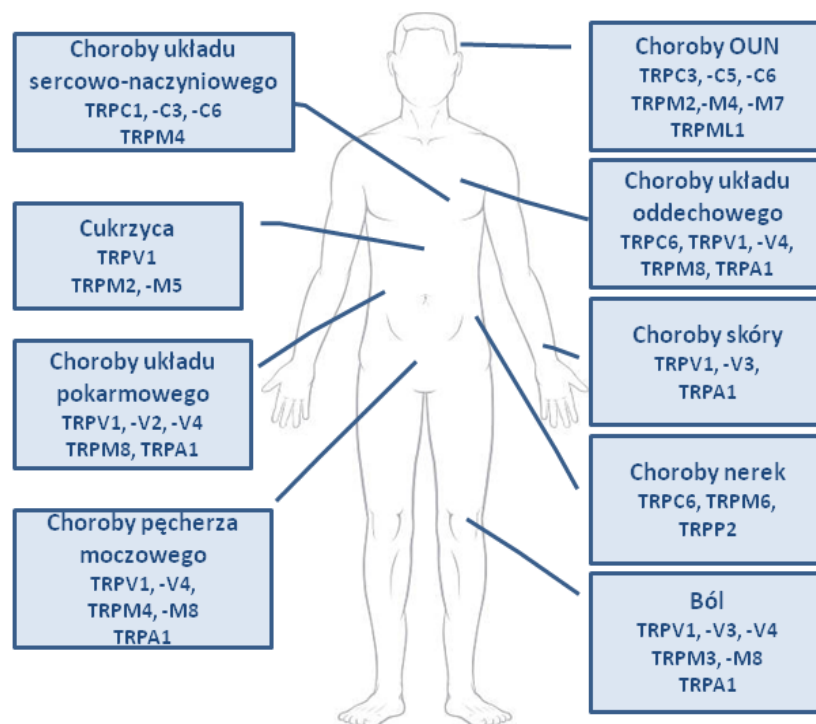
Pierwsze homologi kanałów TRP u kręgowców zostały odkryte dzięki wykorzystaniu klonowania fragmentów TRP przy użyciu reakcji PCR w mózgu myszy oraz oocytach żaby *Xenopus* (Petersen i wsp., 1995), a niedługo później wykazano pełnej długości cDNA TRPC1 w bazie podsekwencji cDNA ludzkiego (expressed sequence tag EST) (Wes i wsp., 1995; Zhu i wsp., 1995). Odkrycia te doprowadziły do eksplozji badań skutkujących odkryciem kolejnych izoform kanałów TRP u człowieka. Zrodziło to pytania oraz badania nad możliwymi funkcjami odkrytych kanałów, szczególnie w kontekście układu nerwowego człowieka.

U ssaków odkryto do tej pory 28 kanałów TRP podzielonych na sześć podrodzin opierając się na ich homologii w sekwencji aminokwasów (Clapham i wsp., 2001) :

- TRPC - 'canonical' – nazwany tak z powodu ich homologii do kanału u *Drosophila*
- TRPV - 'vanilloids' - waniloidy w nawiązaniu do jej pierwszego odkrytego receptora TRPV1, którego ligandem jest m.in. kapsaicyna, spokrewniona z waniloidami
- TRPM - 'melastatin' – mRNA pierwszego kanału tej podrodziny (TRPM1) zostało po raz pierwszy odkryte w łagodnych znamionach, a jego brak w czerniakach złośliwych
- TRPP - 'polycystin' - nazwa od autosomalnej dominującej wielotorbielowości nerek, z którą jest powiązana (z ang. autosomal dominant polycystic kidney disease)
- TRPML - 'mucolipin' - kanał ten bierze udział w etiologii mukolipidozy typu IV
- TRPA – 'ankyrin' – w grupie tej jest tylko jednego receptora, TRPA1, który posiada liczne powtórzenia ankirynowe na końcu N

Nomenklatura tych kanałów została opisana i uporządkowana przez Alexander i współautorów (Alexander i wsp.,2013).

Dysfunkcja kanałów TRP została potwierdzona w wielu chorobach dotyczących ośrodkowy jak i obwodowy układ nerwowy (Ryc. 2), a mutacje w genach kanałów TRP są skojarzone z dziedzicznymi chorobami, tak zwanymi kanałopatiami (Kaneko i Szallasi, 2014).



Rycina 2. Dystrybucja tkankowa kanałów TRP oraz ich rola w patogenezie chorób człowieka

Kanały TRP są zlokalizowane głównie na błonach plazmatycznych i stanowią osobną nadrodzinę kanałów jonowych, odlegle spokrewnioną z kanałami dla jonów K^+ , Na^+ oraz Ca^{2+} . Są ekspresjonowane oraz funkcjonują w wielu organizmach, włączając w to drożdże, robaki, muszki owocowe, myszy oraz człowieka (Islam, 2011). Kanały TRP posiadają sześć transbłonowych domen (S1-S6), z pętlą tworzącą por pomiędzy S5 a S6 (Ryc.3) (Wu i wsp.,2010a). Zarówno koniec $-NH_2$ jak i $-COOH$ są zlokalizowane wewnątrzkomórkowo. Większość kanałów TRP tworzy funkcjonalne kanały, jako homotetramery, ale heteromultimerizacja jest również często obserwowana (Cheng i wsp.,2010).

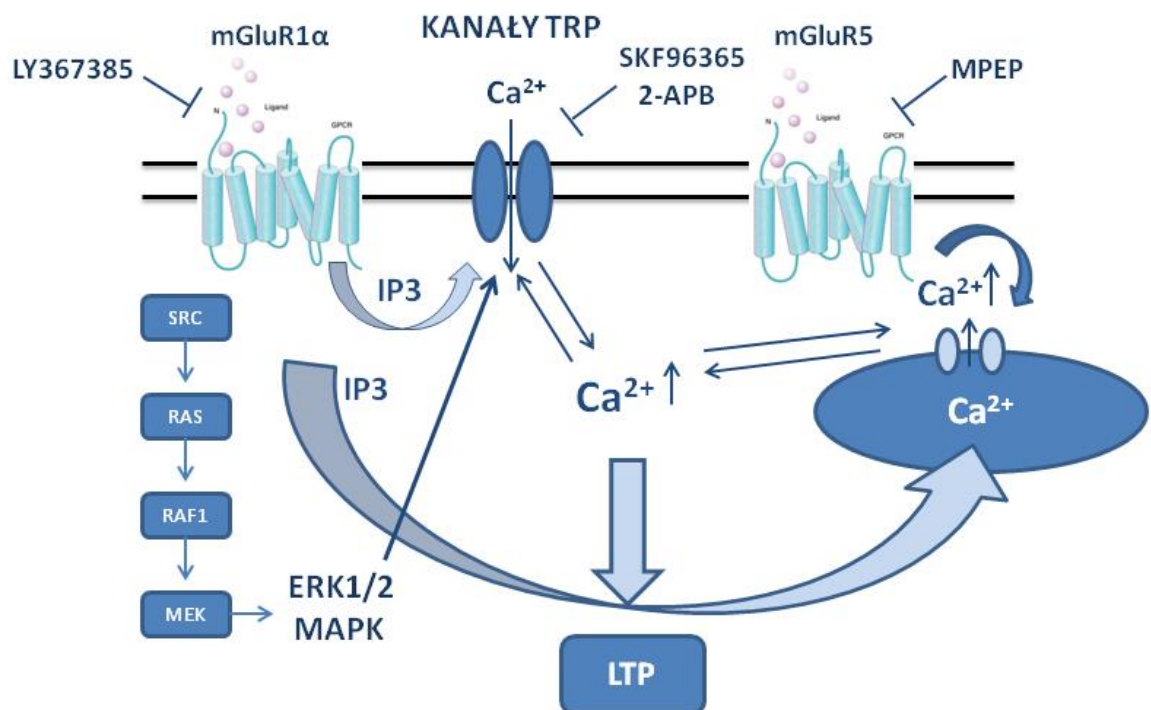
Kanały TRP są 'komórkowymi sensorami' (Clapham, 2003), ekspresjonowanymi prawdopodobnie we wszystkich komórkach ciała (Nilius, 2013), odpowiadającymi za odczuwanie temperatury (Liedtke, 2006), bólu (Patapoutian i wsp.,2009), odbieranie smaku (Nilius i Appendino, 2013), odbieranie bodźców mechanicznych oraz osmotycznych (Guilak i wsp.,2010; Moran i wsp.,2011; Nieto-Posadas i wsp.,2011; Pedersen i Nilius, 2007). Odgrywają również zasadniczą rolę w transmisji sygnałów w układzie nerwowym (Minke, 2010; Wu i wsp.,2010b). Co interesujące, kanały TRP posiadają zdolność do regulowanej translokacji pomiędzy przedziałami komórkowymi, co zostało wykazane dla członków rodziny kanałów TRP, takich jak : TRPC (Bezzarides i wsp.,2004), TRPV (Kanzaki i wsp.,1999), TRPM (Thebault i wsp.,2009) oraz TRPA (Schmidt i wsp.,2009).

Kanały TRP są przepuszczalne dla jonów Na^+ , K^+ , a przede wszystkim dla Ca^{2+} , a aktywowane są wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} oraz IP_3 , dla którego wykryto na ich powierzchni domenę wiążącą (Reboreda i wsp.,2011).

Opisano wiele mechanizmów aktywacji kanałów TRP, ale uważa się, że najczęstszy mechanizm ich aktywacji w mózgu jest powiązany z aktywacją receptorów metabotropowych związanych z białkiem G, w tym metabotropowych receptorów glutaminianu. Zostało wykazane, że DAG oraz IP_3 mogą bezpośrednio wchodzić w interakcje z kanałami TRP (Sawamura i wsp.,2017; Trebak i wsp.,2007). Niedawno wykazano również, że PIP_2 działa jako aktywator przepływu jonów wapnia przez kanały TRPC i TRPV (Lemonnier i wsp.,2008; Rohacs, 2015). Ponadto, uwolnienie wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów zlokalizowanych w ER wywołane aktywacją receptorów IP_3 , także stymuluje aktywność kanałów TRP (Parekh i Putney, 2005; Ramsey i wsp.,2006; Topolnik i wsp.,2006). Ta droga napływu jonów wapnia do komórki jest nazwana napływem sterowanym pojemnościowo (z ang. store-operated calcium entry, SOCE) i opisuje działanie kanałów TRP, a także białek STIM i Orai (Majewski i Kuznicki,

2015). Sensor Ca^{2+} STIM1 w odpowiedzi na opróżnienie wewnątrzkomórkowych magazynów również pośrednio aktywuje kanały TRP. Wykazano, że regulowana translokacja kanałów TRP do błony komórkowej stanowi unikalną składową aktywacji kanałów, a wzrost stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} z następową aktywacją kanałów TRP zarządza funkcjami komórkowymi. Przepływ jonów przez kanały TRP może depolaryzować błonę komórkową i aktywować kanały Ca^{2+} sterowane napięciem (VGCC) jak również wymiennik sodowo-wapniowy (NCX). Plazmatyczna Ca^{2+} ATP-aza (PMCA) oraz Ca^{2+} ATP-aza siateczki sarko/śródpłazmatycznej (SERCA) dodatkowo regulują poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} .

Dotychczas opublikowane badania wskazują na zależność pomiędzy aktywacją mGluR1/5, a otwarciem kanałów TRP i wskazują na ważną rolę aktywacji zarówno mGluR grupy I, a także prawdopodobnie kanałów TRP w generacji LTP, LTD oraz procesie zapamiętywania (Gee i wsp.,2003; Lepanetier i wsp.,2018; Topolnik i wsp.,2006).



Rycina 3. Mechanizm aktywacji kanałów TRPC. Stymulacja receptorów związanych z białkiem G inicjuje kaskadę sygnałową prowadzącą do katalizowanej przez fosfolipazę C (PLC) hydrolizy przyłączonego do błony komórkowej fosfatydyloinozytolo - 4,5 - bisfosforanu (PIP2) do inozytolo -1,4,5 – trifosforanu (IP3) oraz 1,2 diacylglicerolu (DAG). DAG pozostaje przyłączony do błony komórkowej i może bezpośrednio aktywować określone kanały TRP, podczas gdy IP3 dyfunduje przez cytoplazmę i aktywuje receptor IP3. Aktywacja receptora IP3 na powierzchni retikulum endoplazmatycznego inicjuje uwolnienie z niej Ca^{2+} do cytoplazmy oraz wiązanie IP3 do białka kanałów TRP prowadzi do ich aktywacji i napływu Ca^{2+} do komórki

Przeprowadzone do tej pory liczne badania wykazały udział kanałów TRP w procesach uczenia i zapamiętywania, ze szczególnym uwzględnieniem kanałów z grupy TRPC, TRPV oraz TRPM. W prezentowanej pracy skupiono się na zbadaniu udziału w procesach zapamiętywania wybranych kanałów z grupy TRPV i TRPC.

1.4.1. TRPC

Bazując na homologii strukturalnej, kanały podrodziny TRPC są podzielone na trzy podgrupy: TRPC1/TRPC4/TRPC5, TRPC3/TRPC6/TRPC7 oraz TRPC2 (Montell i wsp.,2002; Wu i wsp.,2010b).

Kanały TRPC pełnią w mózgu szereg funkcji (Bollimuntha i wsp.,2011; Selvaraj i wsp.,2010; Vennekens i wsp.,2012). Są one między innymi zaangażowane we wzrost neurytów i kierowanie wzrostem aksonów (Greka i wsp.,2003; Li i wsp.,2005; Wang i Poo, 2005), we wzrost i różnicowanie neuralnych komórek progenitorowych (Du i wsp.,2017; Li i wsp.,2012) oraz w synaptogenezę (He i wsp.,2016; Tai i wsp.,2009). Ostatnio wykazano, że kompleks TRPC1/4/5 zlokalizowany presynaptycznie jest zaangażowany w efektywność transmisji synaptycznej w hipokampie (Bröker-Lai i wsp.,2017).

Wszystkie kanały TRPC są szeroko ekspresjonowane w ludzkim mózgu (Riccio i wsp.,2002). Wykazano, że TRPC1 występuje w wypustkach dendrytycznych neuronów dopaminergicznych (Martorana i wsp.,2006), TRPC6 występuje w proksymalnych dendrytach (Giampà i wsp.,2007), a TRPC5 w jądrach neuronów (De March i wsp.,2006). Podczas rozwoju mysiego mózgu duże gęstości mRNA TRPC4 występują w rejonach pola przegrodowego, mózdzku oraz hipokampu, podczas gdy w mózgach dorosłych zwierząt stwierdzono duże zagęszczenie w opuszce węchowej, rejonach CA1 do CA3 hipokampa oraz zakręcie zębatym (Zechel i wsp.,2007).

TRPC3

Kanały TRPC3 występują w mózdzku, korze mózgowej oraz hipokampie gdzie odgrywają fundamentalną rolę w funkcjonowaniu neuronów (Jia i wsp.,2007; Li i wsp.,2005). TRPC3 jest obecny w neuronach, a także oligodendrocytach (Fusco i wsp.,2004). Kanały TRPC3 promują przeżycie komórek ziarnistych mózdzku w odpowiedzi na neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), pośredniczą w chemoatrakcji indukowanej BDNF zaangażowanej w naprowadzaniu aksonów oraz indukowanym BDNF formowaniem kolców

dendrytycznych. Dodatkowo, kanały TRPC3 mogą być aktywowane wtórnie do receptorów mGlu1 i indukować wolno trwający postsynaptyczny potencjał w komórkach Purkiniego mózdzku (Hartmann i wsp.,2008). Wykazano, że kanały TRPC3 regulują pobudzenie neuronów hipokampa związane z funkcjonowaniem pamięci (Neuner i wsp.,2015).

1.4.2. TRPV

Podrodzina TRPV może być podzielona na dwie grupy : TRPV1-V4 oraz TRPV5-V6. Kanały jonowe z rodziny TRPV mogą być aktywowane różnorodnymi bodźcami, między innymi ciepłem, protonami, lipidami, zmianami osmolalności czy ciśnienia, a także uwalnianiem Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych. Kanały TRPV są ekspresjonowane we wszystkich rodzajach tkanek i organach, biorą też udział w wielu procesach fizjologicznych, a także patofizjologicznych (Kauer i Gibson, 2009).

TRPV1

TRPV1 jest najlepiej poznanym członkiem. W badaniu z 1997 roku przeprowadzonym przez Juliusa i współautorów (Caterina i wsp.,1997) odkryto, że TRPV1 integruje różne bodźce wywołujące ból i odpowiada nie tylko na kapsaicynę, ale również na ciepło (temperatura > 43°C) oraz kwasowe pH (pH < 5,5) (Tominaga i wsp.,1998). TRPV1 jest przede wszystkim ekspresjonowany w neuronach nocycyptywnych (Caterina i wsp.,1997; Nagy i wsp.,2004; Pingle i wsp.,2007). Wykazano również obecność kanałów TRPV1 w wielu strukturach mózgu takich jak podwzgórze, mózdzek, kora mózgowa, rdzeń przedłużony, hipokamp i wielu innych (Kauer i Gibson, 2009; Pingle i wsp.,2007; Steenland i wsp.,2006). Obecność kanałów TRPV1 w tych centralnych strukturach mózgu może być zaangażowana w termoregulację oraz centralne procesowanie informacji o bólu (Gavva i wsp.,2007; Pingle i wsp.,2007; Steenland i wsp.,2006). Badania wykazały, że TRPV1 jest zaangażowany w określone typy plastyczności synaptycznej w hipokampie (Marsch i wsp.,2007). Dodatkowo szereg badań wskazuje na udział receptorów TRPV1 w procesach zapamiętywania. Badania wskazują, że napływa Ca^{2+} przez kanały TRPV1 jest porównywalny do kanału związanego z receptorem NMDA i dlatego może aktywować komórkowe sygnały zależne od Ca^{2+} (Kauer i Gibson, 2009).

TRPV3

TRPV3 jest szeroko ekspresjonowany w keratynocytach, zwojach grzbietowych korzeni rdzeniowych oraz zwojach nerwu trójdzielnego jak również w rdzeniu kręgowym i mózgu

(Peier, 2002; Smith i wsp.,2002; Xu i wsp.,2002). Kanały TRPV3 biorą udział w termalnej nocyciepcji, termoregulacji, wzroście włosów oraz zapalnych schorzeniach skóry (Asakawa i wsp.,2006; Imura i wsp.,2009; Moqrich, 2005; Zimmermann i wsp.,2005). Silny agonista kanału TRPV3 - octan incensolu, który jest składnikiem kadzideł ma działanie anksjolityczne i przeciwdepresyjne (Moussaieff i wsp.,2008). Postuluje się też rolę TRPV3 w plastyczności synaptycznej oraz procesach zapamiętywania, np. pamięci przestrzennej (Brown i wsp., 2013; Pan i wsp., 2011).

1.5. Modulatory kanałów TRP

Część kanałów TRP jest aktywowana produktami naturalnymi, włączając w to zioła, przyprawy, jady czy toksyny (Vennekens i wsp.,2008). Ponadto, oprócz bezpośredniej aktywacji poprzez bodźce fizyczne takie jak m.in. temperatura, ciśnienie osmotyczne czy rozciągnięcie, mogą być one aktywowane lub modyfikowane przez receptory związane z białkiem G oraz kinazy receptorów tyrozynowych produktami hydrolizy fosfatydyloinozytolu (4,5) bifosforanu (PIP2), jakimi są diacylglicerol (DAG) czy inozytolo-1,4,5-trisfosforan (IP3). W celach badań nad kanałami TRP oprócz naturalnych związków aktywujących te kanały, zsyntetyzowano szereg związków działających pobudzająco lub hamująco. Poniżej opisano związki modulujące działanie kanałów TRP użyte w niniejszej rozprawie.

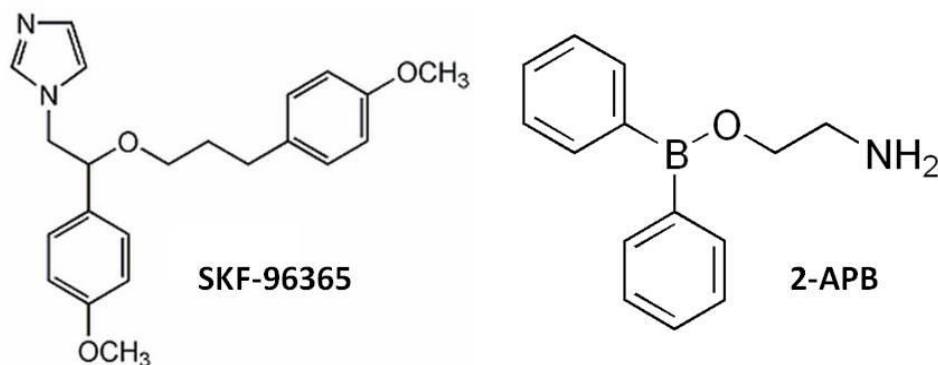
1.5.1. Syntetyczne modulatory kanałów TRP

Specyficzne inhibitory poszczególnych kanałów TRP są nieliczne i trudno dostępne, dlatego w badaniach używane są związki działające na te kanały niespecyficznie i hamujące prawie wszystkich ich przedstawicieli. SKF-96365 oraz boran 2-aminoetoksydifenylu (2-APB) są najczęściej stosowanymi inhibitorami kanałów TRP i te związki zostały użyte w prezentowanej pracy (Bencze i wsp.,2015; Singh i wsp.,2010).

1.5.1.1. SKF-96365

1-[2-(4-Metoksyfenyl)-2-[3-(4-metoksyfenyl)propoksy]etyl]imidazol, w skrócie SKF-96365, użyty w stężeniach do 10 μ M selektywnie blokuje kanały TRPC, hamując receptorowy oraz pojemnościowy napływ wapnia do komórki (Leung i Kwan, 1999; Merritt i wsp.,1990). SKF-96365, równolegle z blokerami nieorganicznymi, był użyty do scharakteryzowania regulowanych receptorowo kanałów TRPC. Wykazano, że blokuje on interakcje TRPC3/5, a

także kanały wapniowe zależne od napięcia oraz receptory IP3 (Putney, 2010). Wykazano ponadto, że SKF-96365 w wyższych stężeniach blokuje również kanały TRPV i TRPM (Harteneck i wsp., 2011).



Rycina 4. Struktura chemiczna wybranych modulatorów kanałów TRP – SKF-96365 oraz 2-APB (Islam, 2011).

1.5.1.2. 2-APB

2-APB został po raz pierwszy opisany w roku 1997, jako inhibitor receptorów inozytolo 1,4,5 trifosforanu (Maruyama i wsp.,1997). W kolejnych latach wykazano, że blokuje on także napływ wapnia sterowany pojemnościowo (SOCE) (Diver i wsp.,2001; Prakriya i Lewis, 2001). Wykazano, że stężenia mikromolarne 2-APB blokują kanały TRP, ze szczególnym uwzględnieniem TRPC3, TRPC5, TRPC6, TRPM2, TRPM3 oraz TRPM7, a z drugiej strony substancja ta w stężeniach wyższych niż 100 μ M ma również zdolność aktywowania innych kanałów TRP takich jak TRPV1, TRPV2, TRPV3 i TRPM6 (Hu i wsp.,2004). Dotychczas nie udało się odkryć dokładnego mechanizmu działania 2-APB prowadzącego do modulacji aktywności kanałów TRP.

1.6. Białka związane z procesami formowania się pamięci

Od rozpoczęcia badań nad formowaniem się pamięci odkryto i przebadano wiele białek biorących udział w tych procesach. Spośród nich, ze względu na ścisłe powiązania ze wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, jak również związku z receptorami metabotropowymi dla glutaminianu do dalszych badań wytypowaliśmy następujące białka -

Neuralna Częsteczka Adhezji Komórkowej (z ang. neural cell adhesion molecule) (NCAM) oraz II Kinaza Zależna od Kalmoduliny (z ang. calcium/calmodulin dependent protein kinase II) (CaMKII).

1.6.1. Neuralna cząsteczka adhezji komórkowej

NCAM jest wielodomenową glikoproteiną należącą do rodziny immunoglobulin, obecną na powierzchni większości neuronów, która przyłącza różnorodne białka adhezyjne w celu modulowania adhezji z innymi komórkami, przekazywania wzajemnych informacji oraz różnicowania podczas wzrostu neuronów (Rønn i wsp.,2000; Schachner, 1997). Charakteryzuje się obecnością domen homologicznych z immunoglobulinami (domen Ig) w części pozakomórkowej. NCAM kodowany jest przez pojedynczy gen umieszczony na chromosomie 9 u myszy (D'Eustachio i wsp.,1985) oraz 11 u człowieka (Nguyen i wsp.,1986) i podlega różnorodnym formom splicingu mRNA (Owens i wsp.,1987; Santoni i wsp.,1987). Jest ona ekspresjonowana w systemie nerwowym kręgowców pod postacią trzech izoform, które powstają poprzez wspomniany wyżej splicing : NCAM-120, NCAM-140 i NCAM-180 w zależności od ich masy cząsteczkowej (Cunningham i wsp.,1987). W obrębie centralnego układu nerwowego NCAM-180 wydaje się być izoformą szczególnie umiejscowioną w miejscach postsynaptycznych, podczas gdy NCAM-140 ekspresjonowany zarówno w neuronach (przed i postsynaptycznie) jak i w gleju, a NCAM-120 głównie z obrębie gleju (Pollerberg i wsp.,1987; Rutishauser i Jessell, 1988). Poszczególne glikoformy NCAM mogą być potranslacyjnie modyfikowane poprzez dołączenie do nich kwasu polisialowego (odkryto co najmniej 27 wariantów mRNA NCAM), co w efekcie zmniejsza ich zdolności połączeń hemofilowych, które prowadzą do zmniejszonej adhezji komórkowej i promują migrację i inwazję komórek. NCAM oraz jego potranslacyjnie zmodyfikowana forma PSA-NCAM jest niezbędna w rozwoju mózgu, procesach plastyczności synaptycznej, formowaniu się pamięci i naprawie uszkodzeń centralnego układu nerwowego (Bisaz i wsp.,2009; Kiss i Muller, 2001; Maness i Schachner, 2007). NCAM jest wysoce ekspresjonowany w połączeniach synaptycznych. Aktywność neuronalna reguluje funkcjonowanie synaps z możliwością wzmacniania lub osłabiania ich działania. Podczas rozwoju, selektywna ekspresja cząsteczek adhezji komórkowej jest uważana za regulującą embriogenezę poprzez ustalanie wzorców

różnicowania komórek, z następową stabilizacją lub eliminacją synaps, jako mechanizm precyzyjnego dostrajania połączeń komórkowych (Edelman, 1984).

Podczas formowania pamięci następuje zwiększone odłączenie kwasu polisialowego od cząsteczek NCAM, co promuje formowanie nowych połączeń neuronalnych (Weledji, 2018). Zostało wykazane, że NCAM jest zaangażowana zarówno w krótkotrwałą jak i długotrwałą plastyczność synaptyczną (Fields i Itoh, 1996; Kiss i wsp.,2001; Maness i Schachner, 2007). Rola NCAM w procesach kognitywnych została zademonstrowana w badaniach, w których interferencja z funkcją NCAM poprzez podanie przeciwciał lub dezaktywację genów skutkowałą upośledzeniem LTP (Lüthi i wsp.,1994; Rønn i wsp.,1995) oraz uczenia się i deficytami pamięci (Cremer i wsp.,1994; Doyle i wsp.,1992). Późniejsze badania wykazały, że myszy NCAM1 knockout (KO) wykazują znaczne zaburzenia pamięci przestrzennej (Cremer i wsp.,1994; Stork i wsp.,2000). Dodatkowo, coraz więcej dowodów wskazuje na kluczową rolę NCAM w nabywaniu i formowaniu pamięci emocjonalnej (Alberini i Kandel, 2014; Benito i Barco, 2015; Conboy i wsp.,2010; Martin i wsp.,2000). Aktywność neuronalna w ciele migdałowatym, części mózgu centralnie zaangażowany w procesowanie emocji, wykazuje zwiększoną aktywność w odpowiedzi na stres u myszy NCAM1 KO w porównaniu do myszy typu dzikiego jako kontroli (Conboy i wsp.,2010; Kiss i wsp.,2001; Venero i wsp.,2006). Dodatkowo, NCAM1 wydaje się być niezbędny do kondycjonowania strachem oraz konsolidacji, jako że słuchowa oraz kontekstualna pamięć strachu była znacząco upośledzona u myszy NCAM1 KO. U szczurów, poziom ekspresji hipokampalnej NCAM1 jest zmienny w sposób zależny od czasu i intensywności. Ekspozycja szczurów na wydarzenie traumatyzujące znacząco upośledza formowanie pamięci przestrzennej i indukuje redukcję izoformy NCAM1 180 kDa w hipokampie (Cunningham i wsp.,1987; Sandi i wsp.,2005; Walmod i wsp.,2004).

1.6.2. Zależna od kalmoduliny kinaza II

CaMKII jest kinazą serynowo/treoninową regulowaną przez kompleks Ca^{2+} /Kalmodulina składającą się z 12 podjednostek tworzących wewnętrzny hub organizacyjny, na który nakładają się katalityczne domeny tworzące dwa pierścienie po 6 jednostek. Fragment regulujący kontroluje aktywność domeny kinazy i w stanie autoinhibicji tworzy α heliksę, która blokuje miejsce katalityczne jako pseudosubstrat. Po przyłączeniu

kalmoduliny, fragment regulujący odłącza się pozwalając na fosforylację substratów, a by w pełni aktywować kalmodulinę niezbędne są cztery zdarzenia przyłączenia Ca^{2+} (Lisman i wsp.,2012).

Kinaza ta ma bardzo szeroki zakres substratów i jest zaangażowana w wiele aspektów funkcji komórek, takich jak regulacja funkcji kanałów jonowych, uwalnianie neurotransmiterów, transkrypcja genów, organizacja cytoszkieletu oraz wewnątrzkomórkowa homeostaza wapnia (Lisman i wsp.,2002). Rola CaMKII w formowaniu pamięci, w kontekście proponowanych przez badaczy modyfikacji synaptycznych, jako niezbędnego elementu uczenia się i pamięci jest szeroko zaakceptowana (Coultrap i Bayer, 2012; Lucchesi i wsp.,2011; Sanhueza i Lisman, 2013). Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} aktywuje kinazę białkową C (PKC) oraz (CaMKII). Enzymy te uruchamiają syntezę specyficznych białek, co jest niezbędnym elementem zapisywania pamięci aktywując czynnik transkrypcyjny CREB. Jako pierwsze syntetyzowane są białka genów wczesnej odpowiedzi komórkowej c-Fos, Jun oraz Zif268. Białka te umożliwiają syntezę białek docelowych, takich jak białka strukturalne oraz inne białka biorące udział w modyfikacji zakończeń nerwowych, jaka ma miejsce w utrwalaniu pamięci.

Zostało wykazane, że CaMKII w hipokampie ssaków fosforyluje i promuje dostarczenie receptorów kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksalopropionowego (AMPA) do błony postsynaptycznej (Barria i wsp.,1997; Hayashi i wsp.,2000; Mammen i wsp.,1997; Passafaro i wsp.,2001). Gra ona również kluczową rolę w hipokampalnym długotrwałym pobudzeniu synaptycznym (LTP) (Fukunaga i wsp.,1993; Lisman, 2003; Otmakhov i wsp.,1997), a postsynaptyczna iniekcja inhibitorów CaMKII lub genetyczna delecja krytycznej dla niej podjednostki blokuje zdolność generowania LTP (Malenka i wsp.,1989).

Krótkotrwała ekspozycja CaMKII na Ca^{2+} /kalmodulinę skutkuje jej aktywowaniem, a poprzez autofosforylację Thr286 pozostaje ona aktywna nawet po usunięciu Ca^{2+} (Miller i Kennedy, 1986). Doprowadziło to do postawienia hipotezy, że może ona funkcjonować raczej jako molekularny przełącznik, a nie wyzwalacz, który jest w stanie przechowywać pamięć długoterminową (Lisman i wsp.,2002). Jednym z typów uczenia się, który oferuje szansę zbadania tej hipotezy jest wdrukowanie wrażeń wzrokowych (visual imprinting), gdzie młode danego gatunku uczą rozpoznawać obiekty (Bolhuis, 1991; Horn, 1985; Sluckin, 1972). Wykazano, że w rejonie IMM mózgu u jednodniowych kurcząt godzinę po treningu wdrukowania wrażeń wzrokowych wzrastały poziomy całkowitej błonowej autofosforylowanej α CaMKII oraz stosunek całkowitej błonowej autofosforylowanej α CaMKII

do całkowitej α CaMKII (Solomonias i wsp.,2005). Poziomy te nie zmieniały się w rejonie kontrolnym mózgu (tylne pole neostriatum/nidopallium) oraz nie utrzymywały się na podwyższonym poziomie w badaniu 24 godziny po treningu, co sugeruje, że CaMKII jest zaangażowana w formowanie się pamięci, jednak nie w jej utrzymanie.

1.7. Model pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych

Model pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych z użyciem kurcząt jest znanym modelem, dzięki któremu można studiować zarówno biochemiczne jak i morfologiczne procesy stojące u podstaw formowania się pamięci (Rose, 2000). Wykorzystywany wzorzec treningu bazuje na wrodzonych odruchach poszukiwania pożywienia oraz dziobania, a ponieważ taka nauka jest znaczącym wydarzeniem w życiu młodego kurczęcia, każde negatywne doświadczenie, w tym modelu w postaci niesmacznego ziarna, jest zapamiętywane. Wykazano, że doświadczenie nabyte podczas takiego treningu skutkowało szybko mierzalnymi zmianami biochemicznymi w mózgach kurcząt.

1.8. Znaczenie projektu

Wzrastająca liczba przypadków zaburzeń pamięci związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi lub powstałymi w wyniku wypadków, wymusza lepsze poznanie tych procesów, a w ostatnim czasie procesy te zaczęto wiązać z niektórymi członkami rodziny kanałów TRP, takimi jak TRPC, TRPM oraz TRPV, które ekspresjonowane są w mózgu człowieka i grają istotną rolę w szerokim spektrum funkcji neuronów oraz komórek glejowych (Tai i wsp.,2009). Przeprowadzone badania wykazały, że zaburzenia ich funkcji towarzyszą zarówno chorobom neurologicznym, jak i psychiatrycznym (Sawamura i wsp.,2017). Ich ważna rola została potwierdzona między innymi w chorobie Alzheimera (Yamamoto i wsp.,2007), chorobie Parkinsona (Nesin i Tsiokas, 2014) oraz udarach mózgu (Zhang i Liao, 2015). Ostatnio wykazano również, że kanały TRPC i TRPV są zaangażowane w procesy behawioralne i poznawcze (Bröker-Lai i wsp.,2017; Lindy i wsp.,2014; Reboreda i wsp.,2011).

Pomimo, że kanały TRP są bramkowanymi napięciem kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , kanały TRP obecne w mózgu są głównie nieselektywnymi kanałami przepuszczalnymi dla Ca^{2+} (Sawamura i wsp.,2017). Do dziś wiemy niewiele na temat zaangażowania kanałów TRP w procesy uczenia się oraz konsolidacji i

rekonsolidacji pamięci, jednak ostatnio opublikowane badania wskazują na ważną rolę tych kanałów w tych procesach. Kanały TRPC, a w szczególności TRPC1, TRPC4 oraz TRPC5 są zaangażowane w procesy roboczej pamięci przestrzennej (Bröker-Lai i wsp.,2017), a kanały TRPC3 modulują pamięć kontekstualną dotyczącą lęku (Neuner i wsp.,2015). Dodatkowo, wykazano również zaangażowanie kanałów TRPV1 w konsolidację kontekstualnej pamięci o lęku, jak również ich zaangażowanie w plastyczność synaptyczną, uczenie i pamięć przestrzenną oraz rozpoznawanie obiektów. Wiemy niewiele na temat zaangażowania innych kanałów TRP w formowanie się pamięci, jednak ostatnio wykazano, że kanały TRPV3 biorą udział w mechanizmach nagrody, a TRPM4 w plastyczności synaptycznej hipokampu oraz uczeniu się (Bovet-Carmona i wsp.,2018; Singh i wsp.,2016).

Biorąc powyższe informacje pod uwagę, naturalnym staje się fakt, że kanały TRP stanowią interesujący cel badań w kontekście formowania się pamięci, a badania dotychczas przeprowadzone wymagają kontynuacji i rozszerzenia w celu dogłębnego zrozumienia ich udziału w tych procesach.

W dalszej perspektywie, zdobyta wiedza umożliwi poszukiwanie skutecznych leków w licznych zaburzeniach neurologicznych i psychiatrycznych oraz da możliwość uniknięcia ich niepożądanych efektów, związanych między innymi z zaburzeniami pamięci. Nie bez znaczenia jest również sama wartość poznawcza tych badań.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Wcześniejsze badania wykazały udział mGluR grupy I w konsolidacji i rekonsolidacji pamięci oraz w przypominaniu już zapamiętanych informacji (Salinska, 2006; Gieros i wsp.,2012). Ponadto wykazano, że proces uczenia w stosowanym modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt jest związany ze wzrostem ekspresji białek zaangażowanych w procesy uczenia (Salinska i wsp.,2006) oraz uwalnianiem Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów (Salinska i wsp.,2001). Aktywacja receptorów glutaminianu grupy I, zarówno mGluR1 jak i mGluR5 powoduje uwolnienie IP3, aktywację receptorów IP3 na siateczce śródplazmatycznej oraz uwalnianie do cytoplazmy Ca^{2+} . To niewątpliwie powoduje aktywację kanałów TRP wskazując na ich udział w badanych procesach. Na podstawie dotychczasowych doniesień wiadomo, że sygnał generowany napływem jonów wapnia do komórki odgrywa ważną rolę w ekspresji białek. Przypuszczamy, że zablokowanie kanałów TRP będzie miało wpływ na ekspresję białek zaangażowanych w formowanie pamięci, co spowoduje upośledzenie procesu zapamiętywania w stosowanym przez nas modelu doświadczalnym.

Celem niniejszej pracy było wykazanie ważnej roli kanałów TRP w formowaniu pamięci i wykazanie, że ich aktywacja może być kluczowym etapem w tym procesie.

Szczegółowe cele badawcze :

- Potwierdzenie obecności kanałów TRP w mózgu kurczęcia w rejonach związanych z formowaniem pamięci, poprzez zbadanie ekspresji białek oraz mRNA
- Dobór optymalnej dawki oraz czasu podania inhibitorów kanałów TRP w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców u jednodniowych kurcząt
- Zbadanie czy zablokowanie wybranych kanałów TRP wpłynie na procesy konsolidacji i rekonsolidacji pamięci oraz na proces przypominania
- Zbadanie czy sygnał wapniowy generowany przez pobudzenie kanałów TRP wpływa znacząco na procesy pamięciowe czy jest tylko sygnałem posiłkowym do generowanego przez receptory mGluR1/5
- Zbadanie czy zablokowanie kanałów TRP będzie miało wpływ na ekspresję wybranych białek związanych z formowaniem pamięci

3. MATERIAŁY I METODY

Wszelkie przeprowadzone eksperymenty wymagające użycia zwierząt zostały wcześniej zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie (Uchwała nr 612/2018) oraz były przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi rządowymi regulacjami (Dz.U.2015. poz.266) jak również dyrektywą Rady Unii Europejskiej z 22 września 2010 roku (2010/63/UE). Ponadto zostały podjęte wszelkie wysiłki by zminimalizować cierpienia zwierząt jak również ich liczbę.

3.1. Model pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt

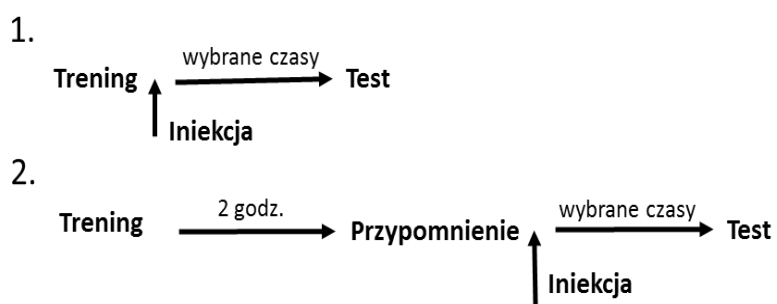
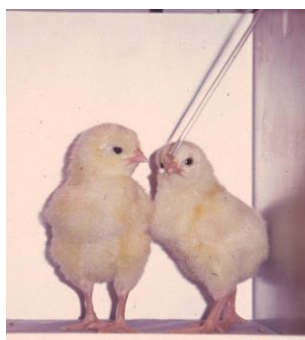
Zastosowany w prezentowanych w tej pracy badaniach model unikania negatywnych bodźców wykorzystuje naturalny odruch dziobania młodych kurcząt. Model ten został po raz pierwszy opisany w roku 1969 przez Cherkina (Cherkin, 1969). Jednodniowe kurczęta płci męskiej rasy Ross i Chunky umieszczane były po 2 sztuki w aluminiowych kubikach o wymiarach 20x25x20 cm, oświetlonych odpowiednim światłem pozwalającym utrzymać w kubiku temperaturę 28-30°C. Zwierzęta miały stały dostęp do karmy oraz wody. Przed rozpoczęciem doświadczenia kurczęta pozostawiane były na godzinę, w celu aklimatyzacji. Po tym czasie, wykonywano tzw. pre-trening służący badaniu naturalnego odruchu dziobania; kurczętom prezentuje się trzykrotnie przez 10 sekund białe sztuczne ziarenko o średnicy około 2 mm, umieszczone na końcu metalowego patyczka. Zwierzęta, które dziobią przynajmniej 2 razy na 3 próby są kwalifikowane do dalszych testów. W kolejnym etapie kurczętom prezentuje się większe, metalowe, sztuczne ziarno (śr. 3 mm) powleczone gorzko smakującą substancją (antranilat metylu; MeA) wywołującą ostrą reakcję absmakową (potrząsanie głową, zamykanie oczu, unikanie dziobania). Kurczęta wykazujące wyżej wymienioną reakcję absmakową zostały zakwalifikowane do dalszych badań. Kurczęta nie dziobiące ziaren były dyskwalifikowane. Z wcześniejszych badań wynika, że pamięć o nieprzyjemnym smaku utrzymuje się do 48 godzin (Gieros i wsp.,2012). 2 godziny po treningu (prezentacja gorzkiego ziarna), uruchamiany był proces rekonsolidacji pamięci poprzez 30 sekundową prezentację w celu przypomnienia negatywnego doznania smakowego identycznego metalowego ziarna, które nie było pokrywane MeA. Kurczęta, które dziobały prezentowane ziarenko były wykluczone z dalszych testów, zaś unikające - kwalifikowane do dalszych badań. Testy pamięci

w obu wariantach eksperymentu wykonywane były w określonych czasach po treningu lub przypomnieniu, poprzez ponowną prezentację metalowego ziarenka. W celu wykluczenia niespecyficznego reakcji kurcząt na prezentowanie ziarenka, po zakończeniu doświadczenia badana była zdolność kurcząt do rozróżnienia prezentowanych ziarenek (dyskryminacja) poprzez ponowne pokazanie białego ziarenka. Kurczęta unikające jego dziobania były wykluczone z ostatecznego zestawienia danych. Dla każdej z grup doświadczalnych badania powtarzano na kurczętach z trzech różnych wylęgów. Grupy kontrolne liczyły 3 x 8-10 kurcząt, a grupy badawcze 3 x 10-12.

Wyniki testów przedstawiane są jako procent zwierząt unikających podczas testu dziobania ziarna identycznego do pokrytego MeA, w stosunku do całkowitej liczby zwierząt w danej grupie badawczej.

3.2. Grupy doświadczalne i podawanie badanych związków

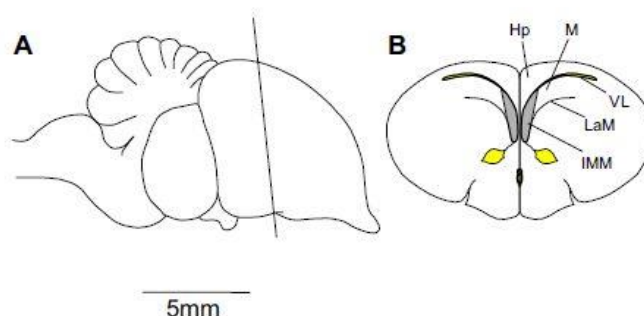
Badania przeprowadzano na dwóch wariantach doświadczalnych (Ryc. 5). Pierwszy z nich obejmował trening i wykonywaną bezpośrednio po nim iniekcję badanego związku, a następnie test unikania po upływie wybranych czasów. Drugi wariant obejmował trening oraz występujące po 2 godzinach od niego przypomnienie, bezpośrednio po którym następowała iniekcja, a po upływie określonego czasu przeprowadzano test unikania.



Rycina. 5 Schemat prowadzonych badań behawioralnych. Schemat stosowany był w badaniach behawioralnych oraz w badaniach wymagających pobierania materiału biologicznego

Związki mogące zakłócić proces konsolidacji lub rekonsolidacji pamięci podawano poprzez obustronną iniekcję badanej substancji do rejonu IMM mózgu kurczęcia, odpowiedzialnego za formowanie pamięci (ryc. 6).

Iniekcje wykonywano techniką „free hand” za pomocą strzykawki Hamilton (20 μ l) z umieszczonym na igle ogranicznikiem umożliwiającym wkłucie na 3,5 mm głębokości. Objętość wstrzykiwanej substancji wynosiła 2,5 μ l na półkulę. Wszystkie związki przygotowywano w stężeniach pozwalających na umieszczenie zaplanowanej dawki w tej objętości. Rejon iniekcji określano kierując się charakterystycznym ukształtowaniem czaszki (miękki rejon czaszki odpowiadający ciemiączku) przez wycucie go opuszką palca. Podane związki dyfundowały w promieniu 1-1,5 mm od miejsca podania.



Rycina. 6 Lokalizacja rejonu IMM w mózgu kurczęcia. A. Reprezentacja boczna mózgu kurczęcia z zaznaczeniem płaszczyzny przekroju. B. Przekrój w płaszczyźnie wieńcowej Hp – Hipokamp, IMM - pośrednio-pośrodkowa część mesopallium, LaM – blaszka meso pallium, M – meso pallium, VL – komora boczna (Solomonias i McCabe, 2015)

W celu zbadania udziału kanałów TRP w procesie zapamiętywania użyto roztworu niespecyficznych blokerów tych kanałów - SKF 96365 (Sigma) w soli fizjologicznej i roztworu 2-APB (TOCRIS) w 8% DMSO. W celu specyficznego zablokowania wybranych kanałów TRP użyto przeciwciał skierowanych przeciwko tym kanałom – anty-TRPC3 (Abcam, Wielka Brytania), anty-TRPV3 (Abcam, Wielka Brytania) i anty-TRPV1 (ThermoFisher Scientific, Stany Zjednoczone) w ilości 0,2 μ g na półkulę mózgu (2,5 μ l roztworu). W badaniach użyto też związków będących specyficznymi blokerami receptorów mGluR1 - 3 mM LY 367385 (TOCRIS) oraz mGluR5 – 8 mM MPEP (TOCRIS), a także selektywnego agonisty mGluR grupy I – DHPG (50 μ M) (TOCRIS). Zwierzętom z grupy kontrolnej podawano sól fizjologiczną.

Związki, podawano w czasach wybranych na podstawie wcześniejszych badań oraz doświadczeń opisanych w pierwszej części przedstawionych w tej pracy wyników badań (Gieros i wsp.,2012; Krolik i wsp.,2020; Salinska, 2006).

3.3. Ocena obecności kanałów TRP w mózgu kurczęcia metodą immunohistochemii fluorescencyjnej

Jednodniowe kurczęta usypiano vetbutalem, po czym przeprowadzano perfuzję dosercową 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w PBS. Następnie izolowane mózgi umieszczano w 4% PFA w temperaturze 4 °C na 24 godziny i przenoszono do 99,9% etanolu w celu dehydratacji. Odwodnione mózgi zatapiano w parafinie. Mózgi kurcząt cięto za pomocą kriostatu (Campden Instruments Ltd., Wielka Brytania) na skrawki o grubości 20 µm zawierające rejon IMM (według atlasu A Stereotactic Atlas of the Brain of Domestic Chick (*Gallus domesticus*), Kuenzel i Masson, 1958), umieszczano na szkiełkach podstawowych, odparafinowywano poprzez zanurzenie w ksylenie (3 x 5 minut) i kolejno w alkoholu etylowym o malejącym stężeniu (95, 90, 80, 70%). Następnie skrawki umieszczano w buforze cytrynianowym o pH 6.0 na 5 minut w 95°C, chłodzono i umieszczano na 20 minut w roztworze proteinyazy K oraz finalnie na 1 godzinę w 4% PFA. Możliwość niespecyficznego blokowania inkubując skrawki z 1% surowicą kozią w buforze fosforanowym z dodatkiem 0,25% Tween 20 (PBST), a następnie przeprowadzano inkubację z pierwszorzędowymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko kanałom TRPV1 (ThermoFisher Scientific, Stany Zjednoczone), TRPV3 (Abcam, Wielka Brytania) i TRPC3 (Abcam, Wielka Brytania), w stężeniach 1:500 w buforze PBST i w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po przemyciu buforem PBST skrawki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi koniugowanymi z fluorescencyjnymi znacznikami (1:500). W badaniach użyto następujące przeciwciała firmy Thermo Fisher Scientific: koźłące przeciwciało Alexa Fluor 546 skierowane przeciwko króliczemu IgG, koźłące przeciwciało Alexa Fluor 546 skierowane przeciwko mysiemu IgG2a oraz koźłące przeciwciało Alexa Fluor 488 przeciw IgG. Do wizualizacji jąder komórkowych użyto odczynnika DAPI (Thermo Fisher Scientific). Wyniki reakcji przeciwciał poddawano wizualizacji przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

3.4. Ocena ekspresji białek w mózgu kurcząt

Ekspresję wybranych białek oraz kanałów TRP mierzono metodą Western Blot. Dwie godziny po treningu lub po przypomnieniu z lewej i prawej półkuli mózgu izolowano rejon IMM

a następnie homogenizowano w buforze RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz (Sigma). Stężenia całkowite białka w próbach oznaczano metodą Lowry.

Przygotowane próbki białkowe nanoszone były na żel poliakrylamidowy (4% warstwa zagęszczająca i 10% rozdzielająca) tak, by w każdej kieszonce znalazło się 30 µg białka. Rozdział prowadzono w aparacie do elektroforezy (Bio-Rad) przy stałym napięciu 150V przez 1 godzinę. Następnie przeprowadzano transfer białek na membranę nitrocelulozową (30V przez 14 godzin). Po zakończeniu transferu membrany przemywano buforem Tris z solą fizjologiczną i 1% Tween 20 (TBST), pH 7,4, a następnie blokowano 5% roztworem odtłuszczonego mleka w TBST przez 15 min.

Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w przedstawionych badaniach rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:500. W badaniach użyto następujące przeciwciała pierwszorzędowe: królicze poliklonalne przeciwciało anti-TRPC3 (Abcam, Wielka Brytania), królicze poliklonalne przeciwciało anti-TRPV1 (ThermoFisher Scientific, Stany Zjednoczone), mysie monoklonalne przeciwciało anti-TRPV3 (Abcam, Wielka Brytania), królicze poliklonalne przeciwciało anti-CaM Kinase II (Millipore, Stany Zjednoczone), szczurze monoklonalne IgG2a przeciwciało anti-NCAM (BD Biosciences, Stany Zjednoczone).

Błony inkubowano w roztworze TBST/5% odtłuszczonego mleka zawierającym odpowiednie pierwszorzędowe przeciwciało przez noc w temperaturze 4°C. Po tym czasie membrany były płukane w TBST, a następnie inkubowane przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z fosfatazą alkaliczną (rozcieńczenie 1:2000). Użyto następujących przeciwciał drugorzędowych: kozłęce poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko mysiemu IgG (Sigma-Aldrich) oraz kozłęce poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko króliczemu IgG (Sigma-Aldrich). Jako białko referencyjne oznaczano ekspresję β-aktyny przy użyciu skierowanego wobec niej przeciwciała firmy MP Biomedicals (Stany Zjednoczone).

Białka uwidaczniane były zestawem Vector Blue SK5300 Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Victor Laboratories, Inc., USA). Membrany skanowano przy użyciu urządzenia Image Scanner III firmy GE Healthcare Life Sciences, a następnie ekspresję białek analizowano przy pomocy oprogramowania do analizy obrazu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin, USA). Wyniki wyrażane były jako stosunek otrzymanej po densytometrii wartości badanego białka do wartości β-aktyny zawartej w danej próbce.

3.5. Ocena ekspresji białek na poziomie mRNA

3.5.1. Izolacja RNA

Tkanekę do oznaczania mRNA pobierano 1 godz. po treningu lub przypomnieniu. Kurczęta poddawano dekapitacji i szybkiej izolacji rejonu IMM. Izolowaną tkankę umieszczano w probówkach zawierających kulki cyrkonowe oraz krzemowe o średnicy 1 milimetra (Bead-beat Total RNA Mini, A&A Biotechnology). Następnie do każdej z próbek dodawano 800 µl fenozolu (Bead-beat Total RNA Mini, A&A Biotechnology). Homogenizację tkanki mózgowej przeprowadzono przy użyciu homogenizatora kulkowego Minilys® (Bertin Instruments) w czterech cyklach po 20 sekund. Po każdym etapie homogenizacji próbki były chłodzone na lodzie w celu zapobiegania degradacji RNA. Ekstrakcję całkowitego RNA z lizatów tkankowych przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu zestawu Bead-beat Total RNA Mini (A&A Biotechnology). Po izolacji RNA zostało oczyszczone z pozostałości genomowego DNA zestawem odczynników Clean-Up RNA Concentrator kit (A&A Biotechnology). Stężenie całkowitego RNA określono poprzez pomiar absorbancji na spektrofotometrze DS-11 UV-Vis (DeNovix). W celu oceny jakości RNA wykonano test 3'/5' integralności RNA zgodnie z protokołem z publikacji Wilkes i wsp. z 2010 roku. Sekwencje starterów użytych do ewaluacji integralności RNA zostały przedstawione w Tabeli numer 1. Próbkę nie zawierającą zdegradowanego RNA przechowywano w temperaturze -80 C° do czasu wykorzystania w analizie ekspresji genów metodą qRT-PCR.

3.5.2. Odwrotna transkrypcja (RT)

Równa ilość całkowitego RNA (4 µg) z każdego z próbek została użyta jako pierwsza nić syntezy cDNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) została wykonana przy wykorzystaniu termocyklera Civic Cyler Ver II (Biogenet) oraz zestawu odczynników TranScriba Kit firmy A&A Biotechnology zgodnie z instrukcją producenta.

3.5.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Reakcję qRT-PCR przeprowadzono na płytkach 96 dołkowych (4tiude FrameStar® 96 well Semi-Skirted PCR Plate, Roche Style) przy zastosowaniu protokołu dwustopniowego

poprzedzonego denaturacją wstępną (95°C przez 300 sekund) zgodnie z następującym profilem termicznym: 95°C przez 300 sekund (denaturacja) (x1), 60°C przez 60 sekund (przyłączanie starterów oraz wydłużanie łańcucha) (x45). Mieszaninę reakcyjną qRT-PCR przygotowano poprzez dodanie do 10 ng cDNA (otrzymanego w reakcji odwrotnej transkrypcji), 200 nM starterów (przedniego oraz wstecznego) oraz 7,5 µl odczynnika 3color Sensitive RT HS-PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology). W celu obliczenia względnej krotności ekspresji transkryptów zastosowano metodę delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak i Schmittgen, 2001) w oparciu o wartości Cq otrzymane z aparatu LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH). Analiza ekspresji genów została przeprowadzona dla 3 powtórzeń (n=3), zawierających po 3 replikaty techniczne. Startery do reakcji qRT-PCR zaprojektowano przy pomocy programów Primer-Blast oraz Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats (Stothard, 2000). Efektywność reakcji/przyłączania starterów (%) wyznaczono w oparciu o krzywą standardową niezależnie dla każdego genu. W analizie ekspresji genów, jako gen referencyjny zastosowano gen *rps7*, którego walidacji dokonano w programie ReFinder, Delta CT, BestKeeper, NormFinder i Genorm zgodnie z procedurą przedstawioną w publikacji (Lenart i wsp., 2017). Sześciu kandydatów na gen referencyjny wybrano z publikacji (Lenart i wsp., 2017). Sekwencje starterów dla genów referencyjnych oraz genów badanych przedstawiono w tabeli numer 1.

Tabela 1. Sekwencje starterów wykorzystanych do oceny ekspresji genów badanych, referencyjnych oraz genu wykorzystanego w teście integralności RNA.

Symbol	Nazwa	N umber w Genbanku	Sekwencje starterów (5'- 3') (przedniego/wstecznego)	Długość produktu otrzymanego w reakcji PCR (bp)	E fektywność E (%)
<i>amk2a</i>	kinaza białkowa II alfa zależna od wapnia/kalmoduliny (z ang. <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha</i>)	N M_204295	ATC GGAAGCTAAAGGGAGCC	95	2 ,08
			T CTTCACGCCGTCATTCTTC		
<i>cam1</i>	cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych (z ang. <i>neural cell adhesion molecule 1</i>)	X M_001234 121	AG AAGTGCAGTATGCTCCCA	109	2 ,00
			ATAAG GAGATGACAGCACTGGG		
<i>apdh3'</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-	N M_204305	CCTGTGGACTTCAATGGT GACAGC	98	

	fosfoglicerynowego (z ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)		TCATACCAGGAAACAAGC TTGACGA		1 ,94
<i>apdh5'</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (z ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)	N M_204305	GTCGGAGTCAACGGATTT GGC GCCACCACTTGGACTTTG CC	80	2 ,01
<i>dha</i>	podjednostka A kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej (z ang. succinate dehydrogenase complex, subunit A)	X M_419054	GTACAGTTTCACCCTACA GGTATC CTACAGGTGCATATCTCTC CATAAA	124	1 ,98
<i>mbs</i>	deaminaza porfobilinogenu/syntaza hydroksymetylobilanu (z ang. hydroxymethylbilane synthase)	X M_417846	CCTGACCTCTGCTTTGAGA TT ACTACCAGGTCAACTTCAT TCC	143	2 ,01
<i>ps7</i>	białko rybosomalne S7 (z ang. <i>ribosomal protein S7</i>)	X M_419936	TGCAAAGATTGTGAAGCC TAATG CAATTCCTTAGCTGCTGT GATG	140	2 ,04
<i>usb</i>	glukuronidaza, beta (z ang. <i>glucuronidase, beta</i>)	X M_425397	GACAGAACAAGGTATCCC AAGAA AGACAGAAGGTGTGGTG TAAAG	109	1 ,99
<i>pl13</i>	białko rybosomalne L13 (z ang. <i>ribosomal protein L13</i>)	N M_204999	AGCCTAGAAGAGCTTAAA CTGG GCTTGCAGTGA CTCTGTA GAT	107	2 ,02
<i>prt1</i>	fosforybozylotransferaza hipoksantynowa 1 (z ang. <i>hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1</i>)	N M_204848	ACCTGGACTTGTCTGCAT AC	92	1 ,97

3.5.4. Analiza statystyczna

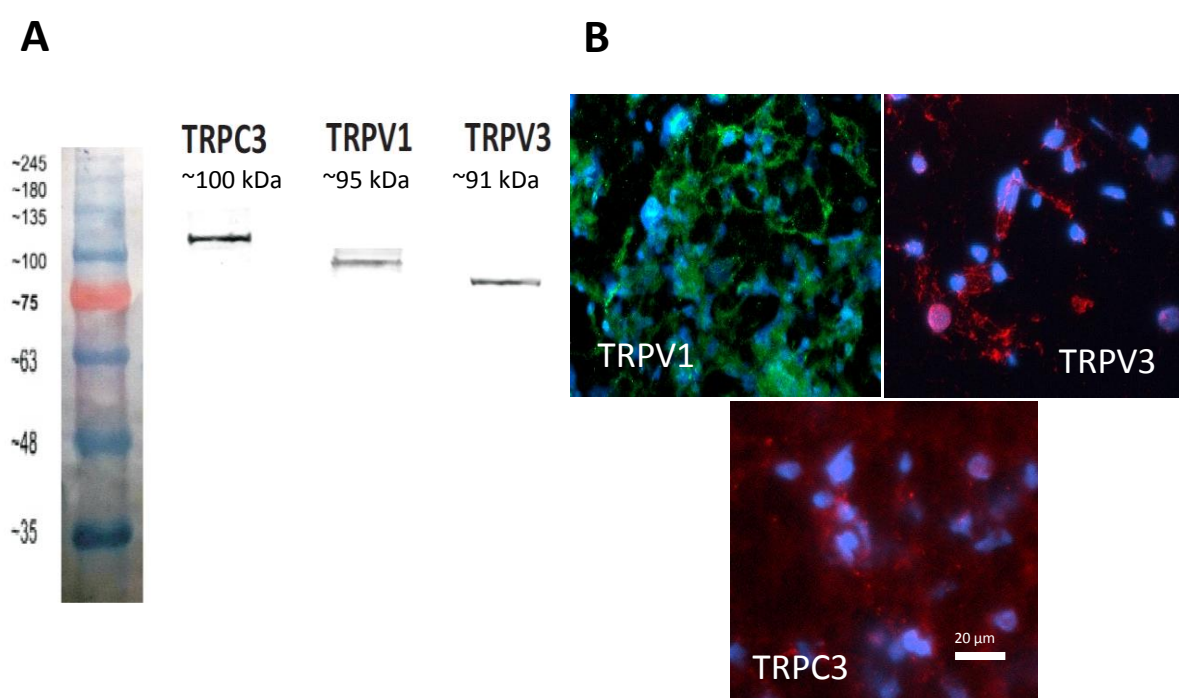
W prowadzonych badaniach behawioralnych w każdej z grup doświadczalnych badania powtarzano na kurczętach z trzech różnych wylęgów. Grupy kontrolne liczyły 3 x 8-10 kurcząt, a grupy badawcze 3 x 10-12. W badaniach biochemicznych na każdą grupę badawczą zbierano

materiał z 3-5 osobników. Wyniki przedstawiono jako średnia arytmetyczna \pm błąd standardowy średniej (SEM) z określonej liczby doświadczeń (n). Zmienność różnic między wartościami średnich badano przy użyciu testu analizy wariacji ANOVA a następnie testem wielokrotnych porównań Bonferroniego przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5 (Rochester, USA). Za wartość graniczną znamienności statystycznej przyjmowano $P < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Potwierdzenie obecności kanałów TRP w rejonie IMM mózgu kurcząt

Pierwszym, a zarazem podstawowym punktem badań było stwierdzenie przy użyciu metody western blot oraz immunohistochemii fluorescencyjnej obecności badanych białek kanałów TRP w rejonie IMM mózgu kurcząt (ryc. 7). Dzięki wykorzystaniu wyżej wymienionych metod potwierdzono obecność kanałów TRPC3, TRPV1 oraz TRPV3 w rejonie IMM mózgu



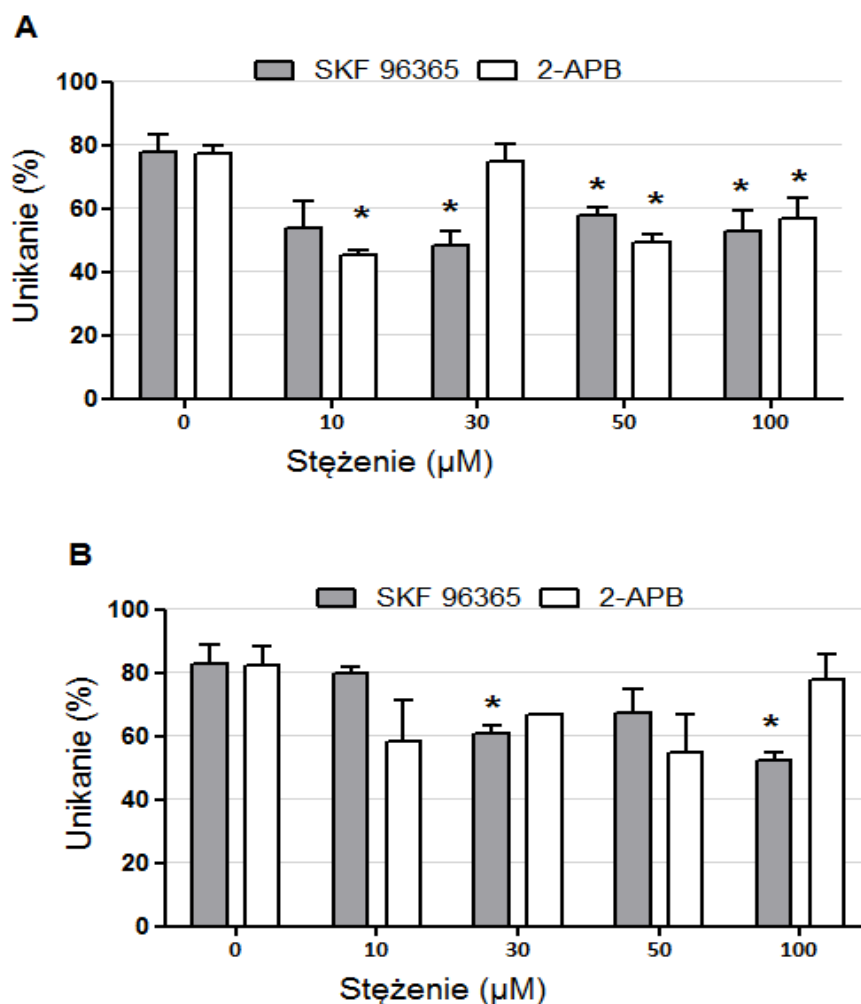
kurcząt.

Rycina. 7. Obecność wybranych kanałów TRP w rejonie IMM mózgu kurcząt pokazane jako: A – analiza Western blot, TRPC3 - ~ 100 kDa, TRPV1 - 96,5 kDa i TRPV3 - 90 kDa; B – analiza immunohistochemiczna, TRPV1 – zielony, TRPV3 – czerwony, TRPC3 – czerwony, jądro komórki - DAPI – niebieski.

4.2. Dobór dawki oraz czasu iniekcji SKF96365

W badaniach doboru dawki, SKF96365 i 2-APB podawano w stężeniach 10, 30, 50 oraz 100 µM bezpośrednio po treningu. Zwierzętom kontrolnym podawano sól fizjologiczną. Unikanie dziobania ziarenka testowano 2 godziny po treningu, kiedy to pamięć dla zadań pamięć gorzkiego smaku jest już dobrze ukształtowana. Dodatkowo, dla pewności, że

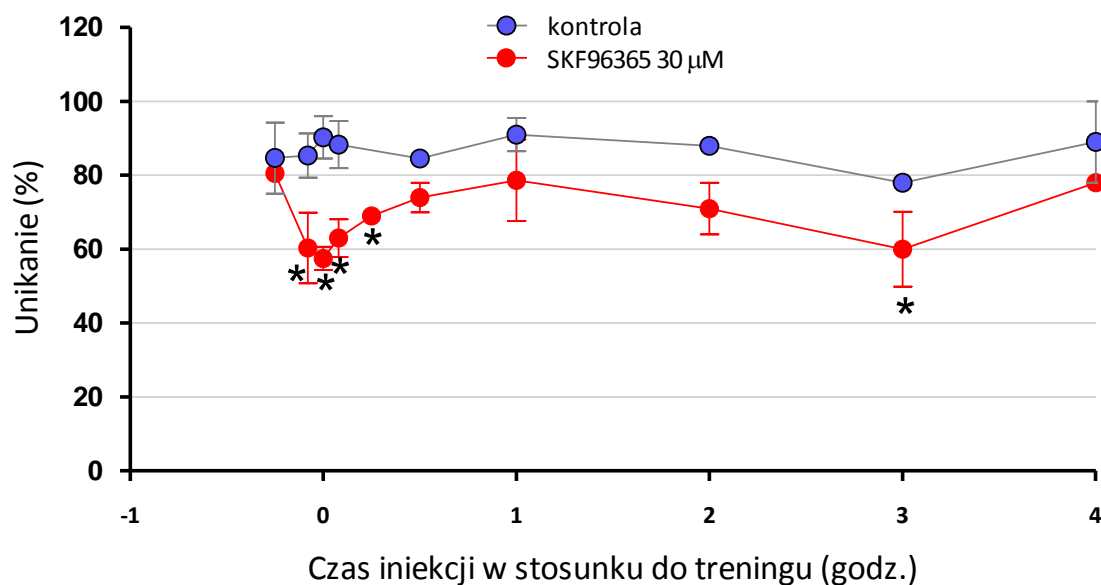
obserwowany efekt jest trwały, zwierzęta były testowane również 24 godziny po treningu (Ryc. 8). Do dalszych badań wybrano najmniejsze, a zarazem najsilniej amnestycznie działające stężenia substancji – SKF 963665 w stężeniu 30 μM ($p < 0,005$, $F_{1,11} = 14,26$) oraz 2-APB w stężeniu 10 μM ($p < 0,001$, $F_{1,6} = 64,15$).



Rycina 8. Wpływ podania różnych stężeń SKF 96365 lub 2-APB na zapamiętanie treningu testowany (A) 2 godziny i (B) 24 godziny po treningu. Związki podawano do IMM bezpośrednio po treningu. Wyniki są zaprezentowane jako średnia \pm SEM; $n = 30$, * - $p < 0,01$ - różnica istotna statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej.

W dalszych badaniach sprawdzono, jaki czas podania SKF 96365 oddziałuje najsilniej na proces formowania pamięci. W tym celu SKF 96365 podawany był w różnym czasie przed i po treningu (Ryc. 9). Zwierzęta testowane były 24 godziny po treningu. Badania wykazały, że iniekcja SKF 96365 w czasie bezpośrednio sąsiadującym z treningiem (od 5 min przed do 30 minut po) powoduje upośledzenie zapamiętywania gorzkiego smaku prezentowanego ziarna. Największy efekt zaburzenia konsolidacji pamięci obserwowany był gdy SKF 96365 podawano

bezpośrednio po treningu; tylko 57,5% kurcząt w grupie badanej testowanych po 24 godz. unikało dziobania, podczas gdy w grupie kontrolnej dziobania unikało 90,25% ($p < 0,005$). Zaobserwowano też wzmożony efekt amnezyczny po podaniu SKF 96365 3 godz. po treningu, gdy unikanie dziobania w grupie kontrolnej wynosiło 78% oraz 60% w grupie badanej ($p < 0,005$). Iniekcję bezpośrednio po treningu, jako wywołującą największy efekt amnestyczny wybrano do dalszych badań. Czas iniekcji 2-APB został określony we wcześniejszych badaniach, gdzie wykazano, że substancja ta również działa najbardziej efektywnie podana bezpośrednio po treningu (Gieros i wsp., 2012).



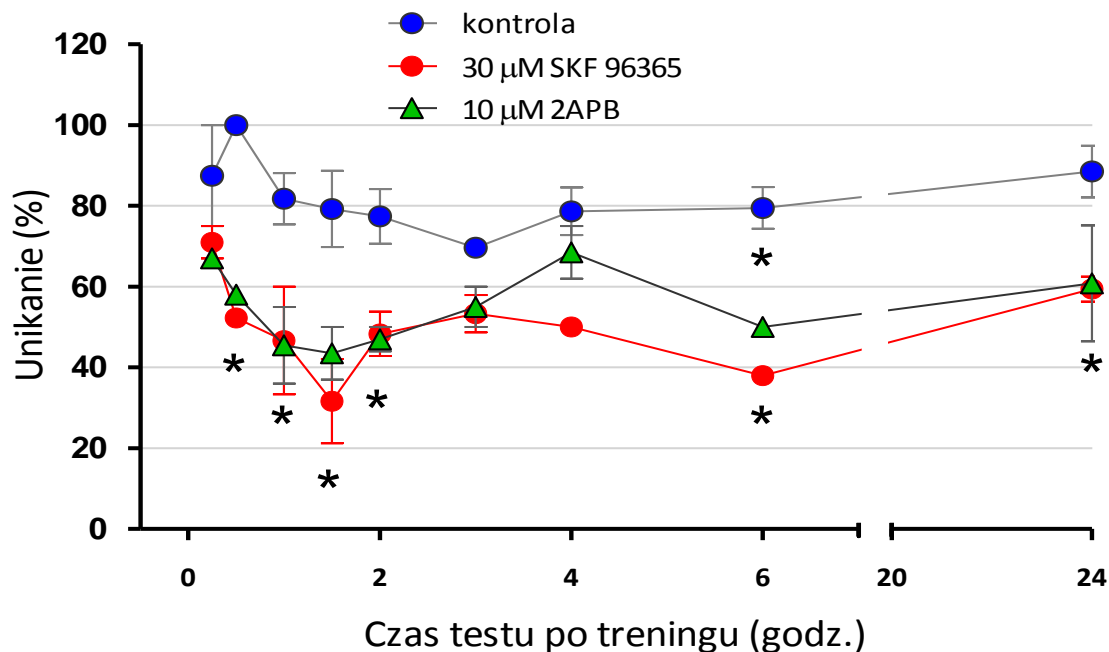
Rycina 9. Wpływ czasu iniekcji w odniesieniu do treningu (punkt 0) na procent unikania negatywnych bodźców smakowych testowany 24 godziny po treningu. Kontrola – iniekcja soli fizjologicznej. Dla każdego punktu czasowego : kontrola $n = 30$, grupy badane $n = 36$, * - $p < 0,05$ - różnica istotna statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej.

4.3. Wpływ zablokowania kanałów TRP na konsolidację i rekonsolidację pamięci

Podanie antagonisty kanałów TRP (SKF 96365) bezpośrednio po treningu powodowało znaczne zmniejszenie liczby kurcząt unikających dziobania metalowego ziarenka podczas testowania w różnych czasach po treningu. Wykazano, iż przy iniekcji SKF 96365 bezpośrednio po treningu, występują dwa okresy w których u badanych kurcząt obserwuje się zwiększoną amnezję – jeden około 1,5 godziny po treningu oraz drugi, około 6 godzin po treningu. Najsilniejszy efekt obserwowano 1,5 godziny po treningu, gdzie w grupie kontrolnej dziobania

unikowało 79,25% kurcząt, natomiast w grupie badanej 31,6% ($p < 0,01$) (Ryc. 10). W grupie zwierząt badanych testowanych 6 godz. po treningu dziobania unikało 38%, podczas gdy w grupie kontrolnej było to 79%.

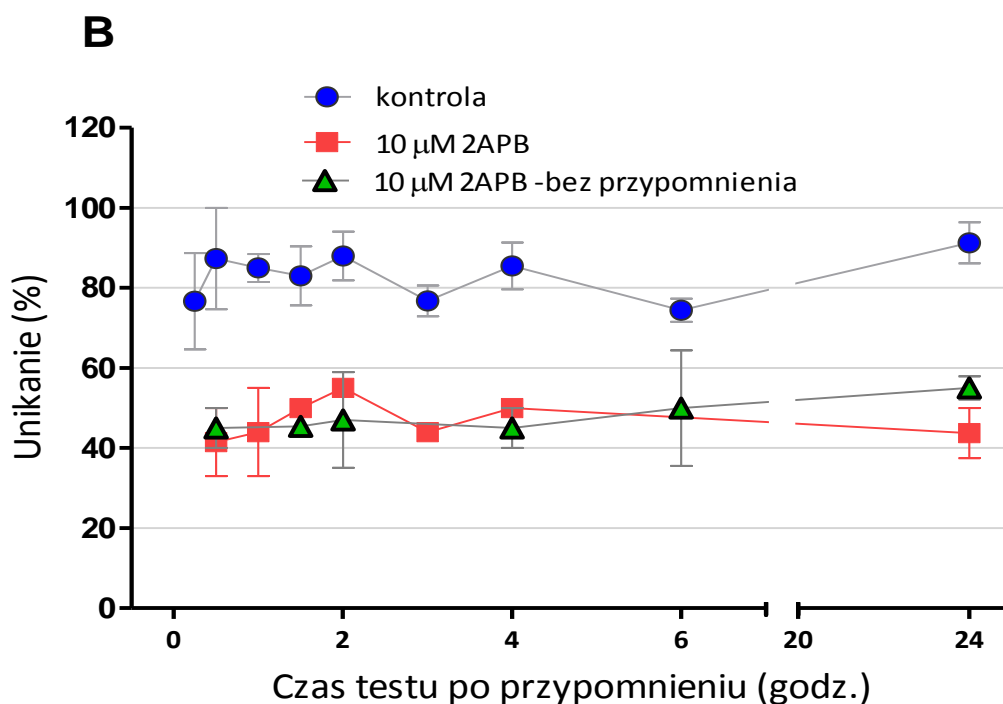
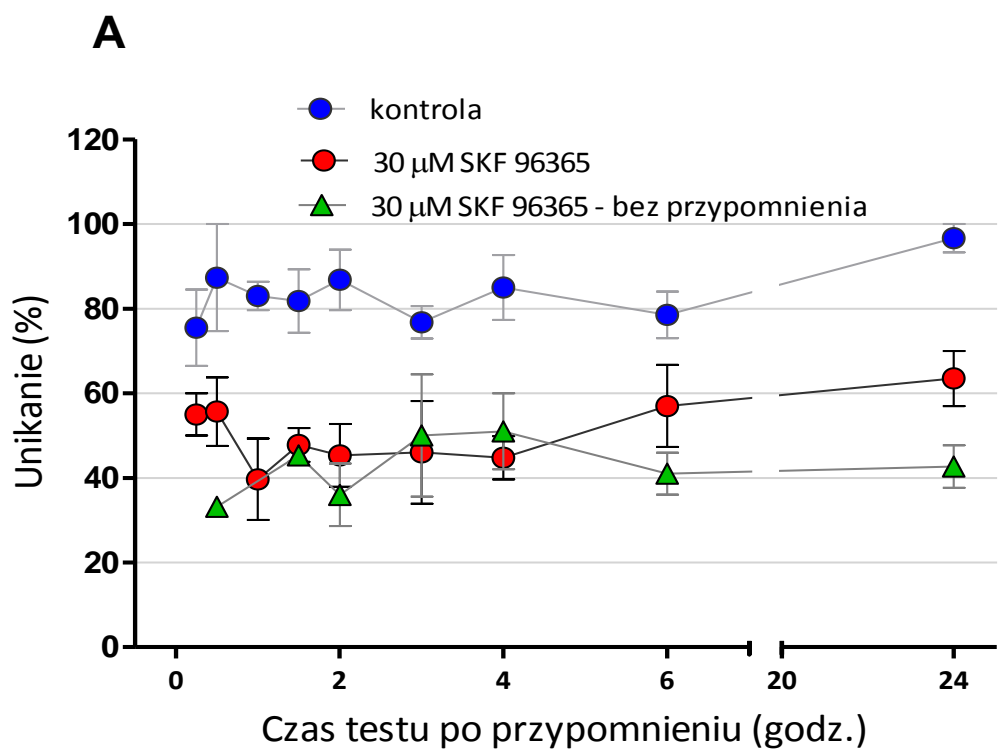
Amnezja wywołana iniekcją SKF 96365 była trwała i utrzymywała się do czasu ostatnich pomiarów, tj. 24 godz. po treningu.



Rycina 10. Wpływ iniekcji 30 μM SKF96356 lub 10 μM 2-APB (2,5 μl/półkulę) w rejon IMM mózgu kurcząt na przypomnienie treningu. Test przeprowadzono w różnych czasach po treningu. Dla każdego punktu czasowego użyto kurcząt z trzech różnych wylęgów (kontrola $n = 30$, grupy badane $n = 36$). Kontrola – 0,9% NaCl. Wyniki zaprezentowano jako średnie \pm SEM; * - $p < 0,01$ - różnica istotna statystycznie w odniesieniu do grupy z kontrolnej.

Podobne zmiany zaobserwowano po podaniu 2-APB w stężeniu, w którym działa jako antagonistą kanałów TRP (10 μM) (Ryc. 11). Wyniki te wskazują na zaburzenie konsolidacji pamięci wywołane podaniem antagonistów kanałów TRP.

Wykazano też, iż iniekcja SKF 96365 bezpośrednio po przypomnieniu treningu przeprowadzonego 2 godz. wcześniej, powoduje istotną statystycznie amnezję, obserwowaną we wszystkich przebadanych punktach czasowych. Procent zwierząt unikających dziobania metalowego ziarenka był najniższy około 1,5 godziny po przypomnieniu (Ryc. 11 A).

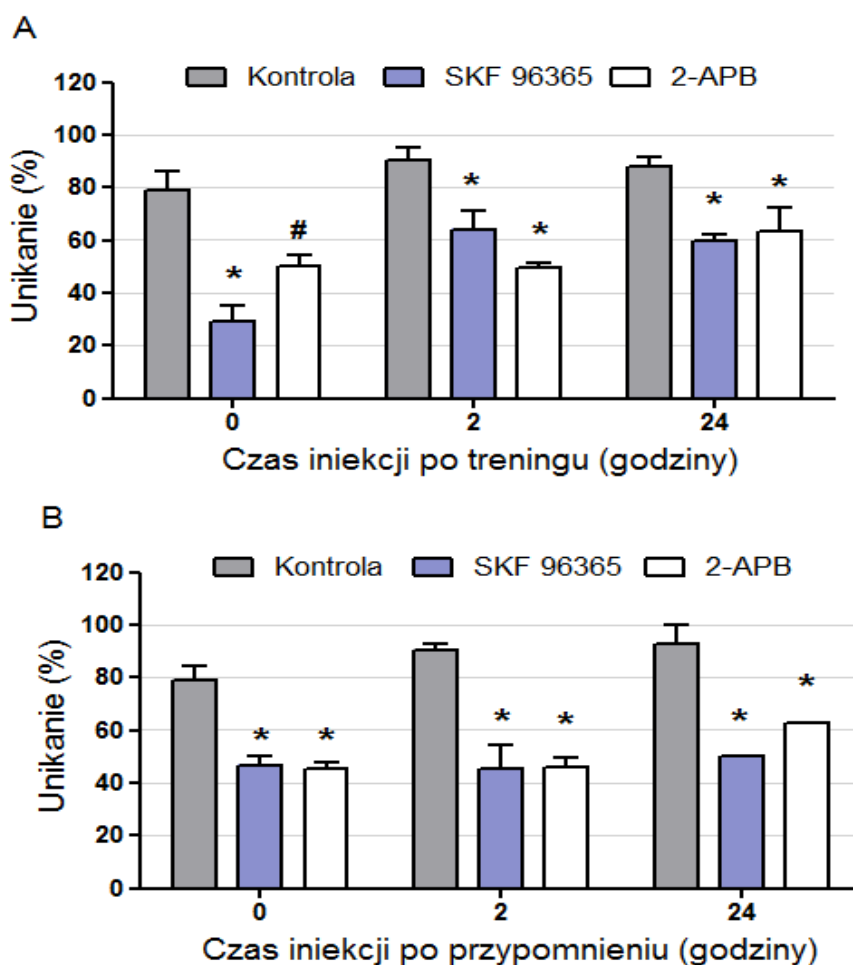


Rycina 11. Wpływ iniekcji 30 μ M SKF 96365 (A) i 10 μ M 2-APB (B) (2,5 μ l/półkulę) w rejon IMM mózgu na przywołanie pamięci po przypomnieniu wykonanym 2 godziny po treningu lub bez niego. Kurczęta były testowane w różnych punktach czasowych po przypomnieniu. Dla każdego punktu czasowego została wykorzystana osobna grupa zwierząt, $n = 30$. Wyniki są zaprezentowane jako średnie \pm SEM; * - $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Zaobserwowano również, że podanie SKF 96365 2 godz. po treningu, ale bez przypomnienia, powodowało taką samą amnezję, jak ta obserwowana po przypomnieniu. W obu przypadkach obserwowana amnezja była trwała. Niemal identyczny efekt wywoływało podanie 10 μ M 2-APB zarówno zaraz po przypomnieniu, 2 godz. po treningu, jak i 2 godz. po treningu, ale bez przypomnienia (Ryc. 11 B)

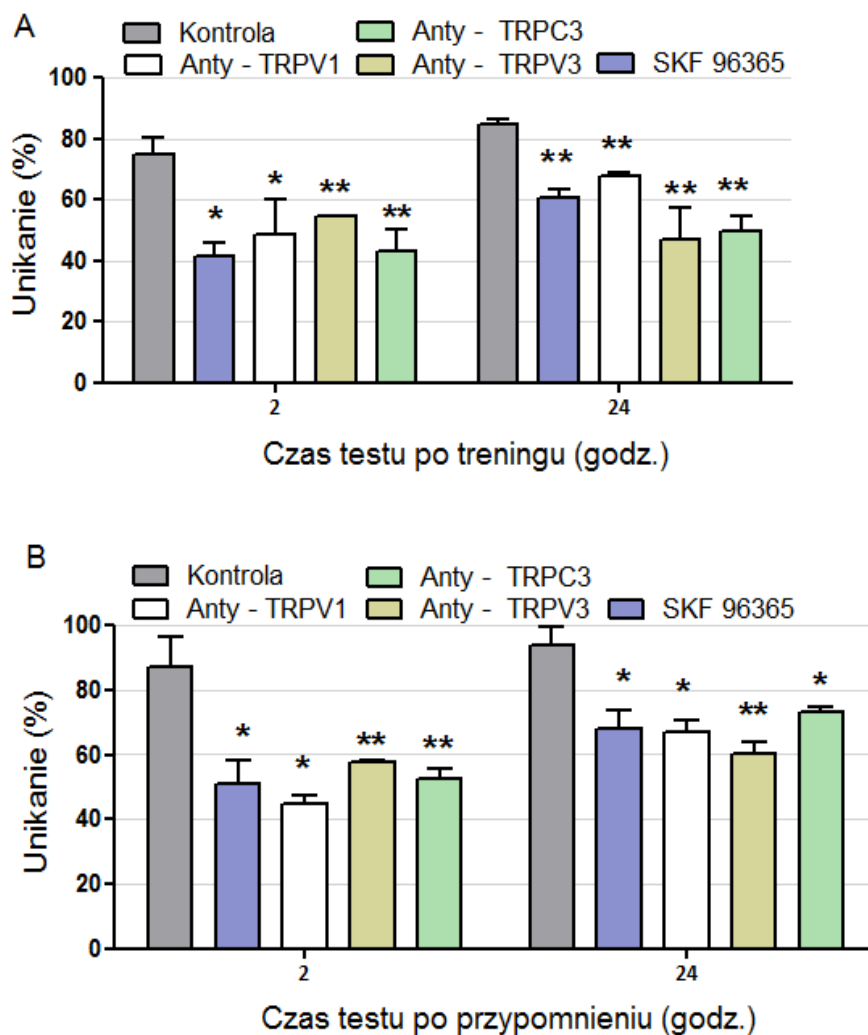
Powyższe wyniki sugerują, że amnestyczny efekt podania SKF 96365 i 2-APB po przypomnieniu jest prawdopodobnie związany z zahamowaniem przywoływania śladów pamięciowych, a nie bezpośrednim wpływem na rekonsolidację pamięci. W celu potwierdzenia tego przypuszczenia zaprojektowano kolejny eksperyment, w którym kurczętom podano wyżej wymienione substancje bezpośrednio po, 2 godziny lub 24 godziny po początkowym treningu lub przypomnieniu. Tak jak we wcześniejszych doświadczeniach, przypomnienie miało miejsce 2 godziny po treningu, a kurczęta testowano 1,5 godziny po iniekcji. Podanie SKF 96365 lub 2-APB bezpośrednio po treningu skutkowało zmniejszeniem liczby zwierząt unikających dziobania z 80% w grupie kontrolnej do odpowiednio 29,3% i 50% (odpowiednio $p < 0,001$, $F_{1,6} = 16,80$ i $p < 0,05$, $F_{1,6} = 12,41$ w porównaniu do grupy kontrolnej) (Ryc. 12 A). Zwierzęta, którym podano testowane związki 2 godziny lub 24 godziny po początkowym treningu także wykazywały amnezję. Iniekcja 2 godziny po treningu skutkowała znaczącym spadkiem liczby zwierząt unikających dziobania z 90% w grupie kontrolnej do odpowiednio 64% i 49,5% dla SKF 96365 i 2-APB (odpowiednio, $p < 0,05$, $F_{1,8} = 16,48$ i $p < 0,001$, $F_{1,8} = 49,81$). Podanie SKF 96365 24 godziny po treningu zmniejszyło unikanie do 59,8% ($p < 0,005$, $F_{1,8} = 24,16$), a podanie w tym samym czasie 2-APB zmniejszyło unikanie do 63,2%. Ilość kurcząt unikających dziobania w grupie kontrolnej dla tego punktu czasowego wynosiła 87%.

W eksperymentach, w których przypomnienie było przeprowadzone 2 godziny po treningu, unikanie, po iniekcjach wykonywanych bezpośrednio lub 2 godziny po przypomnieniu, spadało do około 45% dla obydwu grup czasowych, zarówno w grupie SKF 96365 jak i 2-APB ($p < 0,001$). Upośledzenie przypominania było również obserwowane gdy iniekcje były wykonywane 24 godziny po przypomnieniu. Obserwowane unikanie dziobania gorzkiego ziarna spadało do 50% i 62,5% odpowiednio dla SKF 96365 i 2-APB ($p < 0,005$ dla obu grup, $F_{1,6} = 32,83$ i $F_{1,6} = 26,28$ odpowiednio dla SKF 96365 i 2-APB). Dla kontrastu, zwierzęta w grupie kontrolnej unikały dziobania w 92,7%.



Rycina 12. Efekt podania 30 μ M SKF 96365 lub 10 μ M 2-APB (2,5 μ l/półkulę) na przypomnienie testowany 1,5 godziny po iniekcji. Iniekcje zostały wykonane w różnych punktach czasowych po treningu (A) lub po przypomnieniu mającym miejsce 2 godziny po treningu (B). Wyniki zaprezentowano jako średnie \pm SEM; n = 30; # - p<0,05, * - p<0,01 – istotnie różne od grupy kontrolnej.

Dalszym etapem badań było sprawdzenie efektu blokady wybranych kanałów TRP przez specyficzne przeciwciała (anty-TRPV1, anty-TRPV3 lub anty-TRPC3) i porównanie z efektem podania nieselektywnego antagonisty kanałów TRP (SKF96365) na konsolidację pamięci i rekonsolidację pamięci. Podanie zarówno SKF96365, jak i selektywnych antagonistów określonych kanałów TRP bezpośrednio po treningu, skutkowało obniżeniem unikania dziobania przy testowaniu 2 godz. po treningu z 75% w grupie kontrolnej do ok. 50% w każdej z grup badanych (p<0,05 dla SKF 96365 i anty-TRPV1 oraz p<0,01 dla anty-TRPV3 i anty-TRPC3 w porównaniu do kontroli). Unikanie dziobania testowane 24 godz. po treningu utrzymywało się na poziomie 60% i 67% dla SKF 96365 i przeciwciała anty-TRPV1 oraz 46% i 50% dla przeciwciał anty-TRPV3 i TRPC3 (p<0,01).



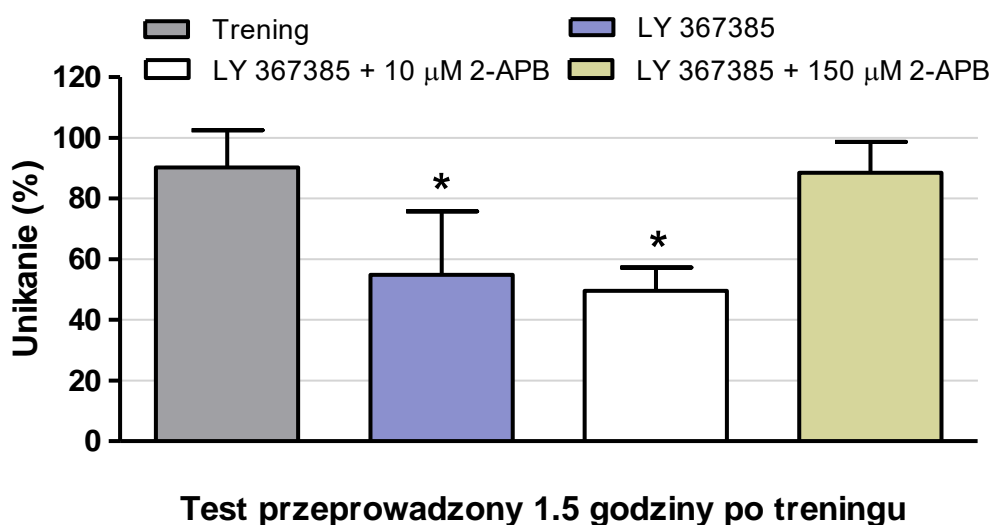
Rycina 13. Porównanie wpływu podania nieselektywnego inhibitora kanałów TRP SKF96365 oraz selektywnego zahamowania określonych kanałów TRP poprzez iniekcję specyficznych przeciwciał na unikanie dziobania obserwowane 2 i 24 godziny po treningu (A) lub przypomnieniu (2 godz. po treningu) (B). Iniekcje były wykonywane bezpośrednio po treningu lub przypomnieniu. Wyniki są zaprezentowane jako średnie \pm SEM; $n = 30$; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Testowanie reakcji na prezentację ziarna u zwierząt, którym podano wymienione powyżej blokery kanałów TRP po przypomnieniu, wykazało 50%, istotną statystycznie amnezję obserwowaną 2 godziny po przypomnieniu ($p < 0,05$ dla SKF 96365 i anty-TRPV1 oraz $p < 0,01$ oraz dla anty-TRPV3 i anty-TRPC3 w porównaniu do kontroli) oraz 60-70% procentową amnezję 24 godziny później ($p < 0,05$). W tym samym czasie 90% zwierząt z grupy kontrolnej unikało dziobania.

4.4 Wykazanie kluczowej roli aktywacji kanałów TRP w procesie formowania pamięci

W celu zbadania jak bardzo sygnał wapniowy generowany pobudzeniem kanałów TRP jest ważny w procesie formowania pamięci u kurcząt w następujących doświadczeniach dokonano manipulacji sygnałami wapniowymi generowanymi aktywacją zarówno kanałów TRP jak i mGluR1 i mGluR5. Manipulacji dokonano poprzez blokowanie lub aktywację wspomnianych receptorów.

Wcześniejsze doświadczenia pozwoliły na ustalenie, że podanie LY 367385, antagonisty mGluR1, tuż przed treningiem lub przypomnieniem treningu najbardziej zaburza formowania pamięci w modelu pasywnego unikania bodźców smakowych (Gieros i wsp., 2012). Natomiast antagonistę mGluR5 – MPEP, najlepiej działa podany zaraz po treningu lub przypomnieniu (Salinska, 2006).

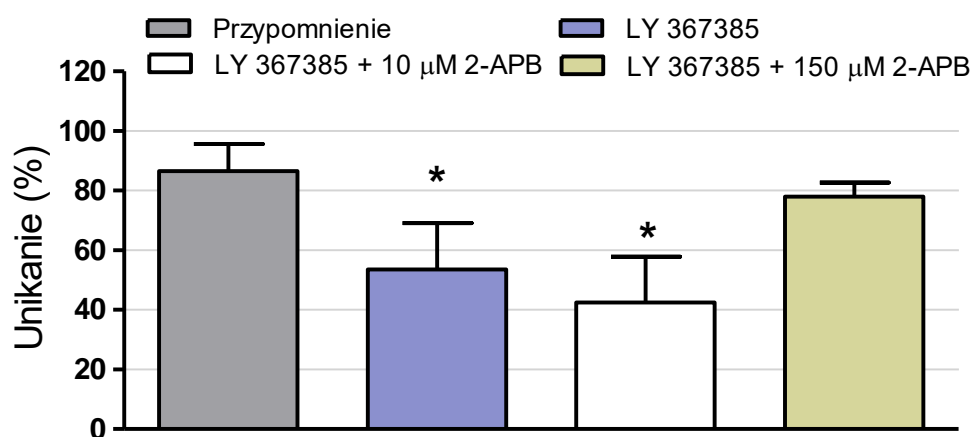


Rycina 14. Porównanie wpływu podania inhibitora kanałów mGluR1α LY 367385, LY 367385 i 10 μM 2-APB oraz LY 367385 i 150 μM 2-APB bezpośrednio przed treningiem na unikanie negatywnych bodźców smakowych przez kurczęta testowane 1,5 godziny po treningu. Wyniki są zaprezentowane jako średnie ± SEM; n = 30; * - p<0,05, różnica istotna statystycznie w odniesieniu do treningu.

Podanie LY 367385, bezpośrednio przed treningiem skutkowało amnezją, objawiającą się statystycznie istotnym obniżeniem unikania negatywnych bodźców smakowych przez kurczęta testowane 1,5 godziny po treningu w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 54,8% vs 90,2%, p<0.05)(Ryc. 14). Podanie LY 367385 razem z 10 μM 2-APB bezpośrednio przed treningiem wywołało nieznaczny dodatkowy spadek unikania dziobania podczas testu

(49,6%) jednak efekt ten nie różnił się statystycznie od efektu podania samego LY 367385 (Ryc. 14). Podanie 150 μ M 2-APB razem z LY 367385 w takim samym schemacie jak poprzednio, niwelowało amnestyczny efekt antagonisty mGluR1, a unikanie dziobania było porównywalne z obserwowanym po treningu w grupie kontrolnej i wynosiło 88,5%.

Podanie LY 367385 bezpośrednio przed przypomnieniem, które miało miejsce 2 godziny po treningu, skutkowało znamienym, w porównaniu do grupy kontrolnej, obniżeniem unikania przez kurczęta negatywnych bodźców smakowych podczas testu przeprowadzonego 1,5 godziny po przypomnieniu (86,5% vs. 53,5%, $p < 0,05$) (Ryc. 15). Iniekcja LY 367385 razem z 10 μ M 2-APB skutkowała dalszym obniżeniem unikania dziobania do 42,5% ($p < 0,05$), jednak efekt ten nie różnił się statystycznie od obserwowanego po podaniu samego LY 367385. Podanie LY 367385 wraz z 150 μ M 2-APB znosiło efekt amnestyczny antagonisty mGluR1 i skutkowało wzrostem unikania dziobania przez 78% badanych kurcząt, a wynik ten nie różnił się istotnie statystycznie względem grupy kontrolnej.

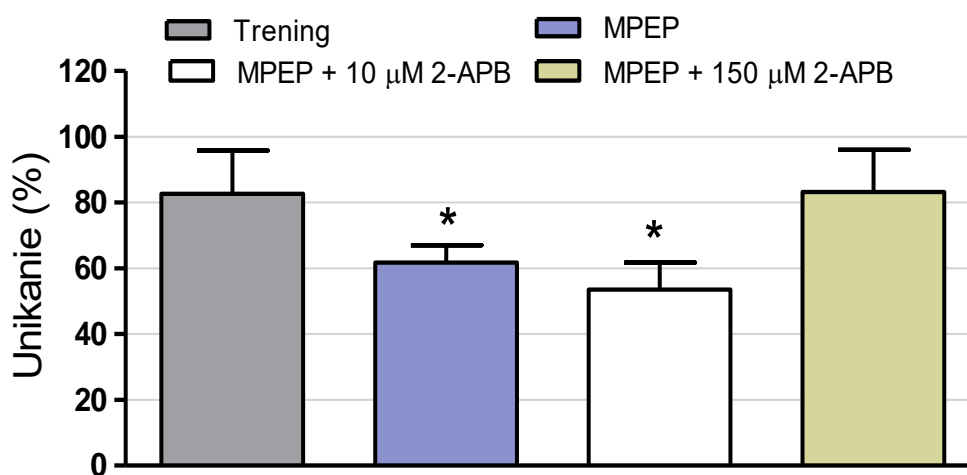


Test przeprowadzony 1.5 godziny po przypomnieniu

Rycina 15. Porównanie wpływu podania inhibitora kanałów mGluR1 α LY 367385, LY 367385 i 10 μ M 2-APB oraz LY 367385 i 150 μ M 2-APB bezpośrednio przed przypomnieniem, które miało miejsce 2 godziny po treningu, na unikanie negatywnych bodźców przez kurczęta testowane 1,5 godziny po przypomnieniu. Wyniki są zaprezentowane jako średnie \pm SEM; $n = 30$; * $p < 0,05$, różnica istotna statystycznie w odniesieniu do przypomnienia + 0,9% NaCl.

Podanie antagonisty receptorów mGluR5, MPEP, bezpośrednio po treningu skutkowało statystycznie istotnym obniżeniem unikania negatywnych bodźców smakowych przez kurczęta podczas testu przeprowadzonego 1,5 godziny po treningu w porównaniu do

grupy, kontrolnej (odpowiednio 82,7% vs. 61,75%, $p < 0,05$)(Ryc. 16). Po iniekcji MPEP razem z 10 μM 2-APB również bezpośrednio po treningu zaobserwowano dalszy spadek unikania podczas testu przeprowadzonego 1,5 godziny później do 53,5%, który był statystycznie istotny w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$), jednak nie różnił się statystycznie od wyników obserwowanych w grupie traktowanej samym MPEP. Podanie MPEP wraz z 150 μM 2-APB w takim samym schemacie jak poprzednio, skutkowało jednak wzrostem liczby kurcząt unikających dziobania prezentowanego ziarna do poziomu porównywalnego z unikaniem obserwowanym w grupie kontrolnej i wynosiło 83,25% (Ryc. 16).

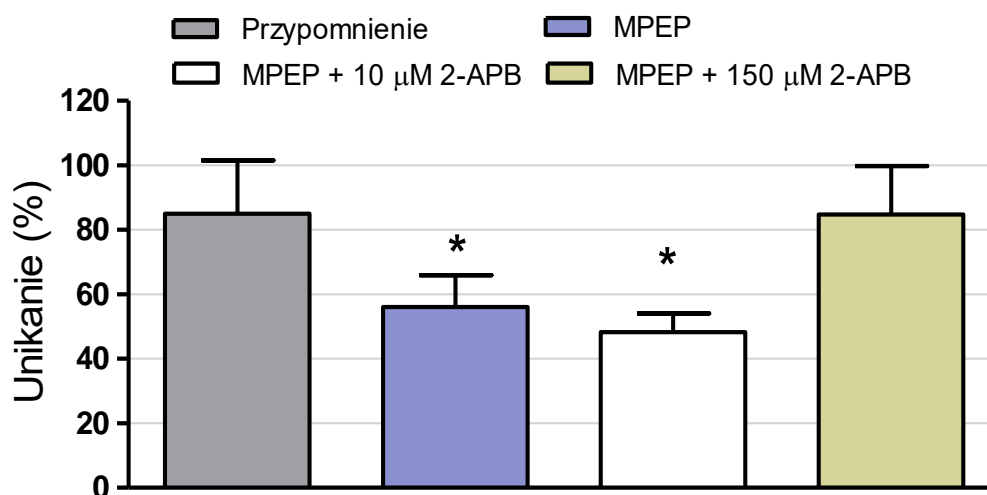


Test przeprowadzony 1.5 godziny po treningu

Rycina 16. Porównanie wpływu podania inhibitora kanałów $m\text{GluR5}$ MPEP, MPEP i 10 μM 2-APB oraz MPEP i 150 μM 2-APB bezpośrednio po treningu na unikanie negatywnych bodźców przez kurczęta testowane 1,5 godziny po treningu. Wyniki są zaprezentowane jako średnie \pm SEM; $n = 30$; * $p < 0,05$, różnica istotna statystycznie w odniesieniu do treningu.

Podanie MPEP bezpośrednio po przypomnieniu, skutkowało statystycznie znaczącym obniżeniem liczby kurcząt unikających negatywnych bodźców smakowych w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas testu przeprowadzonego 1,5 godziny po przypomnieniu (56% vs. 85%, $p < 0,05$)(Ryc. 17). Iniekcja MPEP razem z 10 μM 2-APB skutkowała dalszym, jednak nieznaczącym statystycznie, obniżeniem unikania dziobania prezentowanego ziarna do 48,25% ($p < 0,05$). Podanie MPEP wraz z 150 μM 2-APB skutkowało zniesieniem amnestycznego działania antagonisty $m\text{GluR5}$ i wzrostem liczby kurcząt

unikających dziobania prezentowanego ziarna do 84,8%; wynik ten nie różnił się istotnie statystycznie względem grupy kontrolnej.

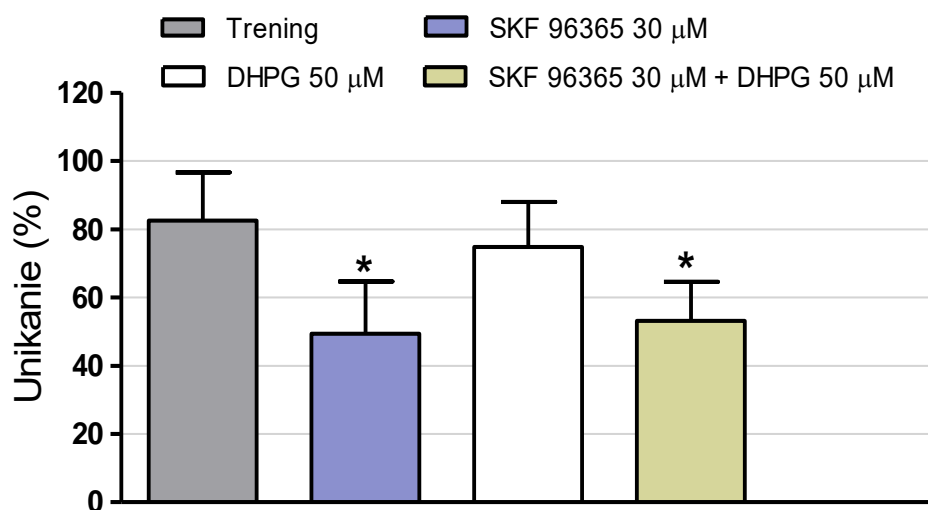


Test przeprowadzony 1.5 godziny po przypomnieniu

Rycina 17. Porównanie wpływu podania inhibitora kanałów mGluR5 MPEP, MPEP i 10 μM 2-APB oraz MPEP i 150 μM 2-APB bezpośrednio po przypomnieniu, które miało miejsce 2 godziny po treningu, na unikanie negatywnych bodźców przez kurczęta testowane 1,5 godziny po przypomnieniu. Wyniki są zaprezentowane jako średnie ± SEM; n = 30; *p<0,05, różnica istotna statystycznie w odniesieniu do przypomnienia.

W następnych badaniach podjęto próbę zbadania czy wzmocnienie sygnału wapniowego generowanego przez aktywację metabotropowych receptorów glutaminianu mGluR1 i mGluR5 zniweluje amnestyczne efekty zahamowania kanałów TRP.

Jak wcześniej wykazano, podanie inhibitora kanałów TRP, 30 μM SKF 96365, bezpośrednio po treningu skutkowało statystycznie istotnym, w porównaniu do grupy kontrolnej, obniżeniem unikania negatywnych bodźców smakowych przez kurczęta podczas testu 1,5 godziny po treningu (odpowiednio 82,5% vs. 49,3%, p<0,05). Po iniekcji bezpośrednio po treningu agonisty kanałów mGluR1α, 50 μM DHPG, nie zaobserwowano statystycznie znaczącej zmiany liczby kurcząt unikających dziobania prezentowanego ziarna podczas testu przeprowadzonego 1,5 godziny w porównaniu do grupy kontrolnej (74,8%; różnica nieistotna statystycznie)(Ryc. 18). Podanie 50 μM DHPG razem z 30 μM SKF 96365 w takim samym schemacie jak poprzednio, nie znosiło amnestycznego efektu antagonisty kanałów TRP i obserwowano obniżenie liczby kurcząt unikających dziobania do 53,1% (p<0.05, w porównaniu do grupy traktowanej SKF 96365)(Ryc. 18).

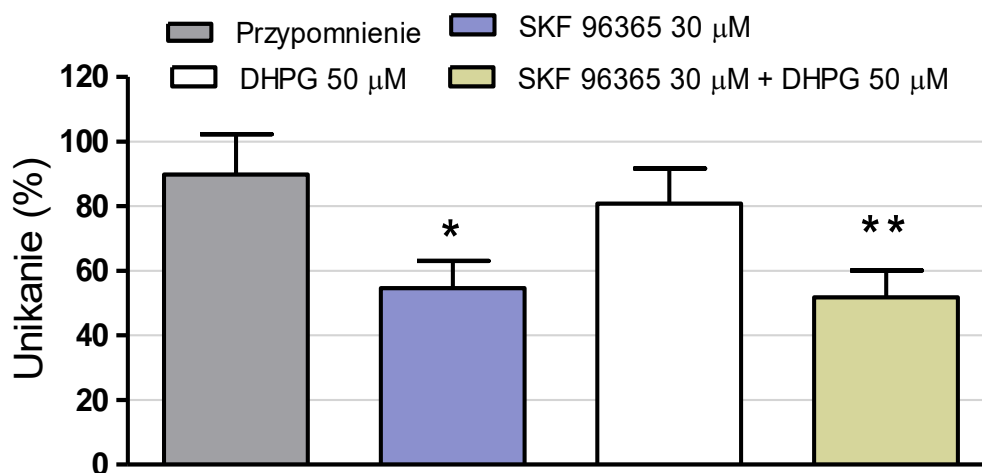


Test przeprowadzony 1.5 godziny po treningu

Rycina 18. Porównanie wpływu podania inhibitora kanałów TRP, 30 μM SKF 96365, 50 μM agonisty kanałów mGluR1α DHPG oraz 30 μM SKF 96365 i 50 μM DHPG bezpośrednio po treningu na unikanie negatywnych bodźców przez kurczęta testowane 1,5 godziny po treningu. Wyniki są zaprezentowane jako średnie ± SEM; n = 30; *p<0.05, różnica istotna statystycznie w odniesieniu do treningu.

Podanie inhibitora kanałów TRP bezpośrednio po przypomnieniu skutkowało statystycznie istotnym obniżeniem unikania negatywnych bodźców smakowych, w porównaniu do grupy kontrolnej, przez kurczęta testowane 1,5 godziny po przypomnieniu (odpowiednio 89,8% vs. 54,6%, p<0,05). Podanie 50 μM DHPG, agonisty kanałów mGluR1α, również bezpośrednio po przypomnieniu nie skutkowało dodatkowym wzrostem liczby kurcząt unikających dziobania podczas testu przeprowadzonego 1,5 godziny po treningu, wynosiło 80,8% i nie różniło się statystycznie od obserwowanego w grupie kontrolnej (Ryc. 19). Natomiast podanie DHPG wraz z 30μM SKF 96365, w takim samym schemacie jak poprzednio, nie niwelowało amnestycznego działania antagonisty kanałów TRP i skutkowało obniżeniem unikania dziobania prezentowanego ziarna do 51,8% (p<0,05 w porównaniu do kontroli).

Przedstawione wyniki wskazują, że zaburzenie pamięci u kurcząt, obserwowane przy zablokowaniu sygnału wapniowego generowanego przez każdy z metabotropowych receptorów glutaminianu z grupy I, jest znoszone przez wygenerowanie sygnału wapniowego poprzez pobudzenie kanałów TRP. Wskazuje to na ważną, a może nawet kluczową rolę aktywacji kanałów TRP w procesie konsolidacji i rekonsolidacji pamięci.

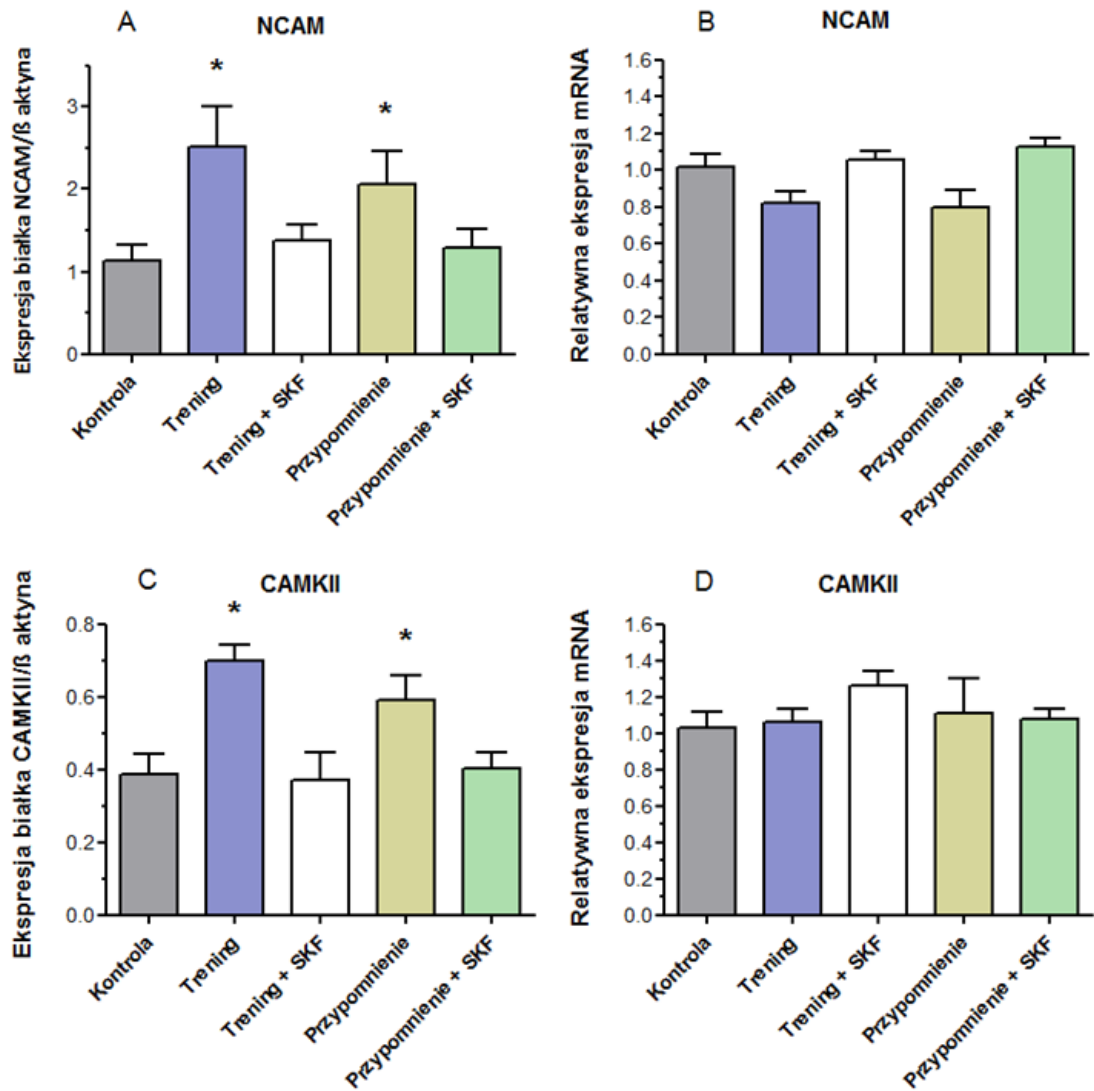


Test przeprowadzony 1.5 godziny po przypomnieniu

Rycina 19. Porównanie wpływu podania inhibitora kanałów TRP, 30 μM SKF 96365, 50 μM agonisty kanałów mGluR1α DHPG oraz 30 μM SKF 96365 i 50 μM DHPG bezpośrednio po przypomnieniu na unikanie negatywnych bodźców przez kurczęta testowane 1,5 godziny później. Wyniki są zaprezentowane jako średnie ± SEM; n = 30; *- p<0,05, różnica istotna statystycznie w odniesieniu do przypomnienia.

4.5. Wpływ SKF96365 na wywołane treningiem i przypomnieniem zmiany ekspresji wybranych białek związanych z procesami zapamiętywania i ich mRNA

Przeprowadzone badania wykazały istotny statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej wzrost ekspresji białek NCAM i CaMKII zarówno po treningu (odpowiednio 193% i 180%; p<0,05), jak i po przypomnieniu (157% i 152%; p<0,05) w porównaniu do kontroli (Ryc. 20). Ekspresja NCAM oraz CaMKII obserwowana po przypomnieniu była niższa niż ta, po treningu, jednak nie różniła się w sposób statystyczny. Podanie SKF96365 bezpośrednio po treningu lub po przypomnieniu spowodowało utrzymanie ekspresji obu białek na poziomie porównywalnym do kontroli.



Rycina 20. Wpływ podania SKF 96365 na wywołane treningiem i przypomnieniem zmiany ekspresji NCAM i CaMKII badanych na poziomie białka (A i C) oraz poziomie ekspresji mRNA (B i D). Wyniki zaprezentowano jako średnią \pm SEM. $n = 4-5$; * - $p < 0,05$, zmiana istotna statystycznie w odniesieniu do kontroli.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach ekspresji mRNA dla NCAM oraz dla CaMKII zarówno po treningu i przypomnieniu w porównaniu do grup kontrolnych, jak również w badanych grupach po podaniu 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.

5. DYSKUSJA

5.1 Kurczęta jako model zwierzęcy

W badaniach nad procesami zapamiętywania najczęściej wykorzystuje się modele zwierzęce oparte na szczurach lub myszach, stosowane są również modele w których do badań używa się ptaków (Pinaud i Terleph, 2008), ryb (Guo, 2004), skorupiaków (Romano i wsp.,2006), a nawet nicieni, jak *Caenorhabditis elegans* (Ardiel i Rankin, 2010).

Model bazujący na jednodniowych kurczętach jest sprawdzonym i wysoce użytecznym sposobem badania wyżej wymienionych procesów (Crowe i wsp.,2008; Matsushima i wsp.,2003; Rose, 2000). Zmiany obserwowane na poziomie białek oraz mRNA w mózgach szczurów lub myszy podczas procesów formowania się pamięci, jak również podczas przypominania mają odzwierciedlenie w zmianach obserwowanych w mózgach kurcząt (Baker i wsp.,2013; Sarasa i Pesini, 2009; Yamada i wsp.,2002).

Sama idea wykorzystania młodych kurcząt do badania komórkowych i molekularnych mechanizmów funkcjonowania pamięci pojawiła się w latach sześćdziesiątych dwudziestego wieku przy badaniu wdrukowania wizualnego jako formy wczesnego uczenia się u niektórych gatunków ptaków (Bateson, 1966). W tym samym czasie Cherkin (1969) rozwinął model unikania negatywnych bodźców smakowych, bazując na tendencji dziobania małych jasnych obiektów, takich jak ziarnka, przez młode kurczęta. Zadanie pasywnego unikania pozwala szybko i w ściśle określonym przedziale czasowym (kurczęta dziobią ziarno w przeciągu 10 sekund od prezentacji) poddać treningowi nawet do 60 kurcząt podczas jednej sesji. Kurczęta dziobiące takie ziarno pokryte gorzką substancją wykazują reakcję absmakową (wycofanie się, wstrząsanie głową) i unikają podobnego, lecz suchego ziarna przez przynajmniej następne 48 godziny. Kurczęta są w stanie odróżnić gorzkie ziarna od innych, co wykazano poprzez prezentowanie ziaren kontrolnych o innych kolorach i rozmiarach. Ponadto w opisywanym modelu kurczęta praktycznie odizolowane są od dodatkowych bodźców mogących wpływać na proces zapamiętywania. Tak zaprojektowane badanie pozwala wytrenować i przetestować około 80% kurcząt w każdej grupie badanej oraz oddzielić ogólny efekt treningu z towarzyszącymi mu wizualnymi, motorycznymi oraz smakowymi doświadczeniami od procesów komórkowych niezbędnych formowaniu się pamięci (Rose i Harding, 1984). Pozwala to na identyfikację biochemicznej kaskady reakcji związanych z konsolidacją i rekonsolidacją pamięci w zakresie minut i godzin po treningu lub przypomnieniu. Dlatego określenie zmian

określonego biochemicznego markera w określonym czasie po treningu lub przypomnieniu, w porównaniu do grupy kontrolnej może wskazywać na jego bezpośrednie zaangażowanie w zachodzące procesy pamięciowe lub jego mobilizację jako część sekwencji prowadzącej do syntezy molekuly lub reorganizacji komórkowej niezbędnej do formowania pamięci. W okresie 40 minut po treningu, choć bez przyporządkowania konkretnej czasowej zależności wykazano wzrost stymulowanego NMDA napływu wapnia do synaptoneurosomów (Salinska i wsp.,1999), wiązania ligandów do glutaminanowego receptora NMDA (Steele i wsp.,1995; Stewart i wsp.,1992), fosforylacji presynaptycznego białka błonowego B50 (znanego także jako GAP43) (Ali i wsp.,1988) oraz translokacji frakcji cytozolowej kinazy białkowej C (PKC) do błony komórkowej (Burchuladze i wsp.,1990). Większość procesów zachodzących w czasie konsolidacji i rekonsolidacji pamięci u jednodniowych kurcząt odpowiada procesom zaobserwowanym w przebiegu procesów pamięciowych u ssaków oraz pokrywa się z obserwowanymi zmianami biochemicznymi.

Jednodniowe kurczęta są silnym modelem zwierzęcym, w którym możliwe jest badanie biochemicznych i morfologicznych procesów leżących u podstaw formowania się pamięci. Kurczęta należą do zagniazdowników, co oznacza, że są zdolne bardzo szybko po wykluciu do samodzielnego życia i muszą od samego początku aktywnie eksplorować otoczenie i nabywać wiedzę na temat środowiska ich otaczającego. Dlatego też uczą się one bardzo szybko identyfikacji ich matki na podstawie bodźców wzrokowych, węchowych oraz słuchowych, rozróżniania pomiędzy jadalnym a niejadalnym jedzeniem oraz zapamiętywania drogi po złożonych trasach. Jednodniowe kurczęta posiadają znaczny atut właśnie w byciu młodymi, ponieważ oznacza to, że nie zdążyły doświadczyć znacznej ilości bodźców do czasu przeprowadzenia eksperymentów. Kolejnym niewątpliwym atutem tego modelu jest łatwość podawania badanych związków. Jednodniowe kurczęta posiadają duże oraz dobrze rozwinięte mózgi oraz miękkie nieskostniane czaszki umożliwiające łatwą iniekcję domózgową substancji, bez potrzeby implantacji kaniul lub stosowania dodatkowego znieczulenia. Praktyczny brak bariery krew – mózg u tych młodych zwierząt dodatkowo zapewnia szybki napływ do mózgu substancji podanych obwodowo.

Kurczęta prezentują, podobnie jak u gryzoni, dwufazowość procesu zapamiętywania – wczesną oraz późną. U gryzoni, faza wczesna procesu zapamiętywania zachodzi w hipokampie, a następnie przenoszona jest do jądra migdałowatego, gdzie zostaje zapisana jako pamięć późna, długotrwała (Almaguer i wsp.,2002; Richter-Levin i Akirav, 2000). Mózg kurcząt różni

się anatomicznie i dlatego faza wczesna zapamiętywania zachodzi w rejonie IMM mózgu, a następnie, około 6 godzin po ekspozycji na bodziec, przechodzi w rejon LPO. Dowody na rolę tych rejonów mózgu w procesy pamięciowe kurcząt są szczegółowo omówione przez Horn i Rose (Horn, 2004; Rose, 2000). Podobieństwa procesów zachodzących w trakcie zapisu pamięci zarówno na poziomie anatomicznym jak i biochemicznym wskazują, że model doświadczalny użyty w prezentowanych badaniach jest w pełni kompatybilny z innymi modelami zwierzęcymi.

Warto dodać, że mózg kurczęcia został już dawno dokładnie zmapowany pod względem anatomicznym i neuroanatomicznym (Firman i Kuenzel, 1988; Matsushima i wsp.,2003). Co więcej został on też całkowicie zmapowany pod względem genetycznym, co znacznie ułatwia planowanie badań na poziomie modyfikacji genetycznych (Groenen i wsp.,2000).

5.2 Obecność kanałów TRP w mózgu kurcząt

Liczne wcześniejsze badania wykazały obecność różnych rodzajów kanałów TRP w mózgu kurcząt. Wykazano obecność kanałów TRPC w błonie omocniowo – kosmówkowej embrionu kurzego, a zablokowanie tych kanałów przy użyciu SKF 96365, skutkowało zahamowaniem angiogenezy indukowanej VEGF, ale nie czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF) (Ge i wsp.,2009). Hutson i wsp. (2017) wykazali obecność kanałów TRPV1 i TRPV4 w komórkach grzebienia nerwowego embrionów kurzych podczas okresów krytycznych dla rozwoju serca oraz twarzy, ale nie łączyli ich z procesami pamięci, lecz ochroną przed wysoką temperaturą. Ich badania pokazały również, że użycie antagonistów tych kanałów chroniło przed indukowanymi hipertermią zaburzeniami rozwojowym (Hutson i wsp.,2017). Kanały TRP uważało się i nadal postrzega głównie jako pośredniczące w odbiorze informacji na temat temperatury. Jordt i Julius (2002) wykazali obecność kanałów TRPV1 w zwojach korzeni grzbietowych kurcząt, a badania genetyczne pokazały ich identyczność w stosunku do TRPV1 szczura w 68% (Jordt i Julius, 2002). Saito i Shingai (2006) przeprowadzili poszukiwania homologów kanałów TRP ssaków związanych z odczuwaniem temperatury, których odkryto do tej pory 9 (kanały z rodziny TRPV, TRPA, TRPM) m.in. u kurcząt. Poszukiwania przeprowadzono w szkicu genomu (draft genome) kurcząt u których odkryli 4 homologi (TRPV1, V2, V3, V4, M2, M5, M8, A1) (Saito i Shingai, 2006).

W przeprowadzonych przez nas badaniach skupiliśmy się na wykazaniu obecności w rejonie IMM mózgu kurcząt wybranych kanałów TRP (TRPC3, TRPV1 oraz TRPV3), które postulowane są do brania udziału w procesach formowania się pamięci oraz przypominania. W przedstawionych tutaj badaniach po raz pierwszy wykazano obecność wyżej wymienionych kanałów bezpośrednio w mózgu kurcząt, a nie jedynie w ich genomie, oraz powiązano ich obecność z procesami zapamiętywania.

Potwierdzenie obecności tych kanałów stało u podstaw dalszych badań ukierunkowanych na zbadanie ich udziału w procesach formowania się pamięci u kurcząt.

5.3 Wpływ blokowania kanałów TRP na procesy formowania pamięci

W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że kanały TRP są zaangażowane nie tylko w konsolidację pamięci podczas zadania pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt, ale także, że ich rola jest znacznie bardziej istotna, niż oczekiwaliśmy. W przeprowadzonych eksperymentach użyliśmy dwóch substancji, SKF 96365 oraz 2-APB, które są znane jako nieselektywne modulatory kanałów TRP, ale działają na różne grupy (Harteneck i Gollasch, 2011). Wiadomo, że SKF 96365, użyty w stężeniach do 100 μM blokuje głównie kanały TRP regulowane diacylglicerolem, takie jak TRPC3 i TRPC6, jak również TRPV1 i TRPV4 oraz w mniej efektywny sposób TRPM2 (Harteneck i wsp., 2011). 2-APB był początkowo używany jako bloker receptorów IP3, jednak dość szybko wykazano, że jego celem są nie tylko receptory IP3. 2-APB, blokuje wszystkie kanały rodzin TRPC i TRPM, jednak w wyższych stężeniach stymuluje kanały TRPV (Harteneck i Gollasch, 2011).

Przeprowadzono badania, które pozwoliły dobrać dawkę każdego ze stosowanych inhibitorów, która wywoływała największy efekt amnezji u trenowanych kurcząt. Ustalone dawki to 30 μM dla SKF 96365 oraz 10 μM dla 2-APB. Wykazano też, że podanie inhibitorów bezpośrednio po treningu skutkowało największą amnezją.

W przeprowadzonych eksperymentach, podanie każdej z tych substancji bezpośrednio po treningu skutkowało stałym upośledzeniem zapamiętywania zadania, a efekt ten manifestował się 15 minut po treningu i utrzymywał co najmniej 24 godziny. Efekt ten jest podobny do tego, jaki miało zablokowanie receptorów mGluR1 i mGluR5 (Gieros i wsp., 2012).

Procedura przypominania, polegająca na wizualnej prezentacji kurczętom ziarna podobnego do użytego podczas treningu reaktywuje uprzednio uformowaną pamięć czyniąc ją wrażliwą na czynniki zaburzające (Anokhin i wsp.,2002; Crowe i wsp.,2008; Gieros i wsp.,2012). Fenomen przejściowej amnezji będący efektem podania określonych substancji po reaktywacji pamięci został zaobserwowany w zadaniach pasywnego unikania u kurcząt oraz w innych modelach eksperymentalnych (Gisquet-Verrier i Riccio, 2018; Miranda i Bekinschtein, 2018). Wykazano, że podanie inhibitorów metabotropowych receptorów glutaminianu z grupy I (mGluR1/mGluR5) po przypomnieniu, które wykonywano 2 godziny po pierwotnym treningu skutkowało przejściową amnezją, która ustępowała po 6 godzinach (Gieros i wsp.,2012; Salinska, 2006). Przejściowa amnezja związana z przypomnieniem w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców u kurcząt została zaobserwowana również po podaniu inhibitorów syntezy białek takich jak anizomycyna lub 2-deoksygalaktoza (Anokhin i wsp.,2002), antagonisty NMDA - AP5 (Summers i wsp.,1997).

W prezentowanych w tej pracy badaniach SKF 96365 lub 2-APB podawano bezpośrednio po przypomnieniu, które miało miejsce 2 godziny po treningu, co skutkowało amnezją, która trwała aż do końca eksperymentu (24 godziny po przypomnieniu). Jednakże, podanie każdego z modulatorów 2 godziny po treningu, po którym nie następowało przypomnienie również skutkowało amnezją trwającą aż do zakończenia eksperymentu. Wcześniejsze badania wykazały, że zablokowanie mGluR5 w podobnym układzie eksperymentalnym (2 godz. po treningu bez przypomnienia) powodowało jedynie przejściową amnezję, natomiast zablokowanie mGluR1 nie miało efektu (Anokhin i wsp. 2002; Gieros i wsp., 2012; Salinska, 2006). Wyniki te sugerują, że efekt amnestyczny obserwowany po zablokowaniu kanałów TRP bardziej przypomina ten wywołany przez blokadę mGluR5, jednak jest bardziej trwały.

Udział metabotropowych receptorów glutaminianu grupy I (mGluR1/mGluR5) w procesach związanych z formowaniem pamięci u kurcząt został potwierdzony wcześniejszymi badaniami (Gieros i wsp. 2012; Salinska, 2006). W wyniku aktywacji tych receptorów aktywowana jest fosfolipaza C, która hydrolizuje fosfolipidy fosfoinozytowe, co prowadzi do uwalniania IP3 i diacyloglicerolu. Uważa się, że generowany przez pobudzenie mGluR1/5 sygnał wapniowy inicjowany przez stymulację receptorów IP3 na siateczce śródplazmatycznej i uwalnianie Ca²⁺ z magazynów tam zlokalizowanych, zapoczątkowuje szlak syntezy białek

niezbędnych w konsolidacji i rekonsolidacji pamięci. Ten sam sygnał wapniowy oraz IP3 działają również pobudzająco na kanały TRP.

Zablokowanie receptorów mGluR1 i mGluR5, a co za tym idzie, zablokowanie sygnału wapniowego generowanego przez ich pobudzenie, wywołuje amnezję. W przedstawionych w tej pracy wynikach ta amnezja była znoszona przez pobudzenie kanałów TRP. Jednak zablokowanie kanałów TRP przy jednoczesnym pobudzeniu receptorów mGlu grupy I nie powodowało zniesienia amnestycznego efektu zablokowania kanałów TRP. Wskazuje to na ważną rolę sygnału wapniowego generowanego przez kanały TRP. Wiadomo, że sygnały wapniowe generowane w komórce różnią się amplitudą, czasem trwania lub lokalizacją w zależności od natury receptora czy kanału który je wywołał. Ponadto mogą być modyfikowane wewnątrz komórek przez organella, które akumulują lub uwalniają Ca^{2+} . Ta różnorodność sygnałów wapniowych związana jest z rolą Ca^{2+} jako wewnątrzkomórkowego przekaźnika, aktywującego wiele enzymów (Thiel i wsp., 2021) i biorącego udział w wielu funkcjach komórki. Biorąc pod uwagę, że kanały TRP aktywowane są sygnałem wapniowym generowanym przez aktywację mGluR1 i mGluR5, a dodatkowo przez IP3 działającego bezpośrednio na kanały TRP (Topolnik i wsp., 2006) oraz fakt, że amnestyczny efekt zablokowania mGluR1/5 był znoszony aktywacją kanałów TRP, można wnioskować, że to właśnie sygnał wapniowy pochodzący z kanałów TRP jest kluczowy w uruchomieniu kaskady reakcji prowadzącej do formowania pamięci.

Prezentowane w tej pracy wyniki sugerują, że rola kanałów TRP w konsolidacji pamięci może być ważniejsza niż wcześniej uważano, choć bazując na uzyskanych wynikach, ich rola w procesach rekonsolidacji pamięci wydaje się wątpliwa lub trudna do udowodnienia przez zastosowany układ eksperymentalny. Zaprezentowane tu wyniki wykazują jednak kluczową rolę badanych kanałów TRP w przypominaniu, czyli przywoływaniu śladów pamięciowych.

Zaangażowanie kanałów TRP w procesy formowania się pamięci zostało opisane wcześniej przez kilku autorów. Na przykład zaangażowanie kanałów TRPM4 – zostało zademonstrowane w specyficznych typach roboczej pamięci przestrzennej oraz procesach pamięci referencyjnej (Bovet-Carmona i wsp., 2018). Wykazano też, że kanały rodziny TRPC, a w szczególności TRPC1, TRPC4 i TRPC5 regulują mechanizmy leżące u podstaw roboczej pamięci przestrzennej oraz elastycznego ponownego uczenia się w motywowanym apetytem labiryntie T i promienistym labiryntie u myszy, poprzez umożliwienie prawidłowej transmisji synaptycznej w neuronach hipokampa (Bröker-Lai i wsp., 2017). W innych badaniach

wykazano, że kanały TRPC3 modulują kontekstualną pamięć strachu u myszy (Neuner i wsp.,2015) oraz są kluczowym komponentem w przetwarzaniu ścieżki jedzenie-nagroda u szczurów (Singh i wsp.,2016). Kanały TRPV1 wspomagają długotrwałe wzmocnienie postsynaptyczne (LTP) i hamują długotrwałe osłabienie postsynaptyczne (LTD) oraz chronią przywoływanie pamięci przestrzennej przed zaburzeniami wywołanymi silnym stresem w teście wodnego labiryntu Morrisa (Du i wsp.,20201). Zostało także wykazane, że konsolidacja pamięci w uczeniu awersyjnym opiera się na szlakach, które zawierają interakcje pomiędzy receptorami metabotropowymi dla glutaminianu, receptorami AMPA, receptorami kannabinoidowymi i receptorami TRPV1 (Back i Carobrez, 2018; Genro i wsp.,2012). Po podaniu dootrzewnowym antagonisty kanałów TRPV1 - I-RTX - przed kontekstualnym kondycjonowaniem strachem myszy, fazy pobierania lub wygasania skutkowały jedynie niewielkim upośledzeniem przypominania, ale znacząco promowały krótkotrwałe i długotrwałe wygasanie śladów pamięciowych (Laricchiuta i wsp.,2013). Z drugiej strony, wykazano, że aktywacja kanałów TRPV1 przez iniekcję kapsaicyny była wystarczającą do przywołania ustanowionej pamięci strachu u myszy, a nawet do aktywowania procesów przypominających rekonsolidację (Kim i wsp.,2014). Mniej wiadomo o roli kanałów TRPV3 w procesach formowania pamięci. Singh i wsp. wykazali rolę kanałów TRPV3 w mezolimbicznym dopaminowym szlaku nagrody aktywowanym jedzeniem, podkreślając ich zaangażowanie jako kluczowy komponent w procesowaniu nagrody (Singh i wsp.,2016).

W naszych badaniach wykazaliśmy, że kanały TRPV1, TRPV3, jak również TRPC3 są zaangażowane w formowaniu pamięci negatywnych bodźców smakowych u kurcząt. Zablokowanie tych kanałów specyficznymi przeciwciałami podanymi bezpośrednio w rejon IMM mózgu kurcząt, powodowało amnezję obserwowaną zarówno 2 godziny po treningu lub przypomnieniu, jak i 24 godziny później.

Wyniki badań zaprezentowane w tej rozprawie doktorskiej wskazują, że aktywacja kanałów TRP jest kluczowa w konsolidacji pamięci i prawdopodobnie w jej rekonsolidacji w zadaniu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt. Dodatkowo, aktywacja kanałów TRP jest niezbędna dla przywołania śladów pamięciowych, jako że zahamowanie aktywności kanałów TRP w różnych czasach po początkowym treningu oraz po przypomnieniu skutkuje trwałym upośledzeniem przywoływania pamięci o zadaniu.

Ponadto, opierając się na naszych obserwacjach, możemy wnioskować, że aktywacja kanałów TRPV1, TRPV3 i TRPC3 jest niezbędna dla konsolidacji pamięci oraz kluczowa do

przywoływania śladów pamięciowych w zadaniach unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt. Jednakże, wyjaśnienie zaangażowanie kanałów TRP w rekonsolidację pamięci wymaga przeprowadzenia większej liczby badań. Fakt, że zahamowanie napływu wapnia do komórki poprzez kanały TRP skutkuje trwałym, a nie przejściowym upośledzeniem pamięci, jak ma to miejsce podczas blokady receptora mGluR5, sugeruje, że sygnał wapniowy, generowany przez kanały TRP jest niezbędny dla procesów pamięciowych. Odkrycie to także sugeruje, że sygnały wapniowe generowane aktywacją receptorów mGlu grupy I mogą odgrywać jedynie rolę wspomagającą oraz że ich ważnym zadaniem może być aktywacja kanałów TRP. Jednakże założenie to wymaga wsparcia poprzez przeprowadzenie dodatkowych badań.

Przedstawione wyniki wskazują również, że aktywacja kanałów TRP jest elementem wewnątrzkomórkowej kaskady prowadzącej do syntezy białek niezbędnych do zapisania informacji, a zablokowanie tych kanałów wiąże się z zaburzeniami ekspresji białek oraz amnezją.

Kolejne eksperymenty zaprojektowane były w celu ustalenia czy zaburzenia przywoływania śladu pamięciowego przez zablokowanie aktywacji kanałów TRP wiązało się z zaburzeniami w ekspresji wybranych białek zaangażowanych w procesy formowania pamięci.

5.4 Ekspresja białek oraz mRNA NCAM i CaMKII

Molekularna kaskada, która następuje po doświadczeniu uczenia się i leży u podstaw procesów konsolidacji pamięci jest relatywnie dobrze zbadana i w swojej ogólnej formie i wymiarze czasowym była weryfikowana w wielu jednozadaniowych modelach bazujących na wykorzystaniu różnych gatunków zwierząt. Kluczową fazą jest dla niej wczesny okres obejmujący około godziny po treningu, kiedy to następuje aktywacja wczesnych genów, takich jak *c-fos*, z następowym zwiększeniem ilości białka *c-fos*. Efekt ten obserwowany był również w modelu formowania pamięci użytym w prezentowanej rozprawie doktorskiej. Wykazano, że ekspresja białek wczesnej odpowiedzi takich jak *c-Fos*, *Jun* i *Zif/268* mierzona 2 godziny po treningu wzrastała w rejonie IMM obu półkul mózgu kurcząt (Freeman i Rose, 1999; Salinska i wsp., 2004). Aktywacja wczesnych genów uruchamia proces syntezy białek tzw. późnej odpowiedzi, w tym NCAM oraz CaMK II. Następuje okres, w którym białka adhezji komórkowej (takie jak na przykład NCAM) są syntetyzowane, a następnie glikozylowane i transportowane

do błon synaptycznych, gdzie są do nich włączane i w ten sposób modulują łączność synaptyczną (Maness i Schachner, 2007; Rose, 1995; Schachner, 1997). Okna czasowe syntezy białek są dość dobrze poznane, a podczas ich trwania pamięć jest wrażliwa na inhibitory syntezy białek, które powodują amnezję. Po zakończeniu procesu konsolidacji pamięć wydaje się być niewrażliwą na te inhibitory. Zauważono jednak, że reaktywacja pamięci czyni ją ponownie wrażliwą na te substancje (Crowe i wsp., 2008; Sherry i wsp., 2010). Ponadto wykazano, że kaskada reakcji biochemicznych zachodząca po przypomnieniu i związana z rekonsolidacją pamięci nie jest taka sama jak ta występująca po treningu (Salinska i wsp., 2004). Trenowanie kurcząt w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych skutkuje początkową aktywacją procesów komórkowych związanych z formowaniem pamięci w rejonie IMM. Uważa się jednak, że dalsze reakcje komórkowe, związane z utrwalaniem pamięci krótkotrwałej w pamięć długotrwałą zachodzą w innym rejonie mózgu kurczęcia – lobus parolfactorius (LPO) (Kossut i Rose, 1984; Rose i Csillag, 1985). Przypomnienie treningu powoduje ponowne uruchomienie kaskady reakcji wewnątrzkomórkowych i ponowne uwrażliwienie ich na działanie inhibitorów syntezy białek (Anokhin i wsp., 2002). Zarówno po treningu, jak i przypomnieniu występuje zwiększona aktywność metaboliczna rejonów IMM i LPO, a przypomnienie powoduje uwrażliwienie pamięci na interferencję poprzez inhibitory potranslacyjnej glikozylacji, podobnie jak po treningu, jednak z inną kinetyką. Podanie inhibitorów syntezy białek po przypomnieniu skutkuje przejściową amnezją. Wykazano zwiększoną ekspresję c-fos w rejonie LPO mózgu kurcząt, który to został wykazany jako bardziej znaczący dla przywoływania śladów pamięciowych, niż dla pierwotnego uczenia się (Patterson i Rose, 1992). Jednakże w późniejszych badaniach uzyskano wyniki wskazujące, że c-fos oraz inny gen szybkiej odpowiedzi Zif/268 są ekspresjonowane po przypomnieniu również w IMM (Salinska, 2006).

W przeprowadzonych przez nas w ramach tej pracy doktorskiej badaniach obserwowaliśmy po treningu istotny statystycznie wzrost, w porównaniu do kontroli, ekspresji białek NCAM i CaMKII w rejonie IMM mózgu jednodniowych kurcząt. Poziom ekspresji obu białek był porównywalny do kontroli, gdy bezpośrednio po treningu kurczętom podano domózgowo SKF96365. Przypomnienie treningu również skutkowało wzrostem ekspresji obu białek, podobnym do obserwowanego po treningu. Podanie SKF96365 bezpośrednio po przypomnieniu skutkowało obniżeniem ekspresji obu białek do poziomu jaki obserwowano po podaniu SKF96365 po treningu.

Solomonias i wsp. (1998) stosując metodę imprintingu, wykazali, że u kurcząt ekspresja każdej z izoform NCAM (180, 140 i 120 kDa) zwiększa się istotnie 24 godziny po treningu lewym IMM, oraz że istnieje istotna korelacja pomiędzy ilością każdej z izoform NCAM, a tym jak dobrze kurczęta uczyły się. Nie wykazano zależnych od uczenia się różnic w ekspresji NCAM w innych badanych rejonach mózgu. Badając proces zapamiętywania w ramach tej samej metody (imprintingu) wykazano również wzrost ekspresji CaMK II w IMM, co powiązano z udziałem tego białka w formowaniu pamięci (Solomonias i wsp. 2005).

Trenowanie kurcząt przy użyciu MeA skutkuje ekspresją i redystrybucją NCAM w zakresie połączenia synaptycznego (Rusakov i wsp., 1994; Skibo i wsp., 1997). Co interesujące, specyficzna blokada syntezy NCAM za pomocą antysensownych oligonukleotydów w ciągu 24 godzin po wykluciu, zanim kurczęta są trenowane nie zapobiega uczeniu się unikania gorzkiego smaku, ale skutkuje amnezją, która pojawia się w ciągu następnych 3 godzin (Mileusnic i wsp., 1999). Jak wykazano, interferencja z funkcjonowaniem już zsyntetyzowanego NCAM jest także amnestyczna. Przeciwciała łączące się z pozakomórkowymi domenami NCAM wstrzyknięte w rejon IMM mózgu kurcząt 5-6 godzin po treningu wywołują u nich amnezję gdy testowane są 24 godziny później (Scholey i wsp., 1995, 1993), w czasie, w którym przeciwciała nie są już wykrywalne w mózgu.

Przytoczone wyniki badań wskazują, że wzrost ekspresji zarówno NCAM jak i CaMK II odgrywa ważną rolę w procesie formowania pamięci w modelu zapamiętywania negatywnych bodźców smakowych u kurcząt. Jak wykazano w tej pracy, zablokowanie kanałów TRP bezpośrednio po treningu lub przypomnieniu skutkuje spadkiem ekspresji tych białek w obu przypadkach. Obserwowany spadek ekspresji NCAM i CaMK II wiążemy z amnezją jaka pojawia się po podaniu związków blokujących kanały TRP. Wyniki te wskazują, że pobudzenie kanałów TRP i napływ przez nie jonów Ca^{2+} jest niezbędne do aktywacji syntezy tych białek i prawidłowego uformowania śladu pamięciowego.

W wielu badaniach nad procesami uczenia się i zapamiętywania wykazano, że przeprowadzenie treningu skutkuje wzrostem ekspresji mRNA dla białek biorących udział w tych procesach. Dotyczy to również ekspresji mRNA dla badanych w tej pracy NCAM oraz CaMK II. Albrecht i współautorzy (2010) przeprowadzili badania poziomu ekspresji mRNA dla NCAM w ciele migdałowatym oraz hipokampie u myszy po przeprowadzeniu treningu warunkowania strachem. Wykazali oni znaczny wzrost ekspresji mRNA dla NCAM w jądrze bocznym ciała migdałowatego po treningu, spadek do poziomu 0,4 w stosunku do kontroli w

jądrze podstawno-bocznym oraz brak zmian w ekspresji mRNA dla NCAM w badanych podregionach hipokampu.

Vukojevic i współautorzy (2020) zbadali ekspresję mRNA NCAM-1 u *C.elegans* po kondycjonowaniu awersyjnym bodźcem zapachowym. Wykorzystali do tego pozyskane 4 godziny po kondycjonowaniu RNA nicienia i wykazali istotny statystycznie wzrost ekspresji mRNA NCAM-1 w stosunku do nietrenowanych osobników. Co ważne, wzrost ten był zbadany w całkowitym RNA nicienia, a nie wybranym, specyficznym rejonie jego mózgu, jak w przeprowadzonych w tej pracy badaniach.

Igaz i współautorzy (2004) skupili się na ocenie zmian ekspresji mRNA CaMKII α w hipokampie szczurów Wistar 3 oraz 24 godziny po jednorazowym treningu unikania (z ang. one-trial inhibitory avoidance training) (Igaz i wsp.,2004). Po 3 godzinach ekspresja mRNA była istotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak po 24 godzinach nie wykazano różnic w ekspresji między kontrolą, a grupą badaną.

W prezentowanych w tej pracy badaniach nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach mRNA NCAM oraz CaMKII, zarówno po treningu jak i przypomnieniu w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami którym nie podawano SKF 96365, a tymi którym ten związek został podany bezpośrednio po treningu lub przypomnieniu. Przypuszczamy, że wpływ na taki wynik mogły mieć efekty wcześniejszych bodźców jakim uległy kurczęta, takim jak poznawanie nowego otoczenia po przeniesieniu ich do kubików, w których przeprowadzany był trening. Taki wniosek potwierdzają wcześniejsze badania, w których wykazano, że poznawanie nowego otoczenia przez kurczęta przez 1 godzinę powodowało znaczący wzrost ekspresji mRNA dla c-fos w rejonie IMM (Anokhin i wsp., 1991). Takiego wzrostu nie obserwowano u kurcząt, które przebywały w tym samym otoczeniu przez 2 dni.

Uformowanie pamięci długotrwałej wymaga ekspresjonowania nowych genów biorących udział w tym procesie. Wymaga to udziału nie tylko nowosyntetyzowanych mRNA, ale też translacji białek na matrycy mRNA powstałych w wyniku wcześniejszej odpowiedzi na bodźce i przechowywanych w nieaktywnej formie w synapsach, a aktywowanych nowym bodźcem (Sudhakaran i Ramaswami, 2017). Wiadomo, że mRNA jest transportowane do zakończeń synaptycznych, gdzie aktywność synaptyczna pobudza ich lokalną translację. Wykazano, że wśród wielu przechowywanych w zakończeniach synaptycznych mRNA znajduje się mRNA dla CaMK II) (Batish i wsp.,2012; Ohashi i Shiina, 2020). Prezentowane w tej pracy

wyniki sugerują, że również mRNA dla NCAM może być przechowywane w zakończeniach synaptycznych.

Możemy przypuszczać, że w wyniku treningu i przypomnienia treningu badane w tej pracy białka NCAM i CaMKII są syntetyzowane na matrycy mRNA utworzonej wcześniej, na przykład po umieszczeniu kurcząt w nowym środowisku. Powyższe wyniki sugerują również, że przebiegające w rejonie IMM mózgu kurcząt procesy pamięciowe badane w prezentowanych doświadczeniach, związane są ze wzrostem translacji, ale nie transkrypcji mRNA dla NCAM i CaMKII.

Zahamowanie ekspresji białek NCAM i CaMK II przez podanie SKF96365 bezpośrednio po treningu jak i po przypomnieniu, w połączeniu z obserwacją występowania amnezji, pozwala na wyciągnięcie wniosku, że kanały TRP biorą udział nie tylko w konsolidacji pamięci i procesach przypominania, ale także najprawdopodobniej w rekonsolidacji pamięci.

Podanie SKF-96365 hamuje syntezę CaMK II i NCAM, których ekspresja w warunkach naturalnych rośnie po treningu i przypomnieniu, wskazują, że generowany przez aktywację kanałów TRP sygnał wapniowy odgrywa ważną rolę. Jednak sam mechanizm regulacji ekspresji badanych białek przez kanały TRP nie jest jeszcze znany. Regulacja ekspresji białek może zachodzić poprzez regulację poziomów białka związanego z łamliwym chromosomem X (FMRP) kodowanego przez gen *FXR1*. Białko to jest białkiem wiążącym i transportującym mRNA, a także kontrolującym translację jako czynnik kończący ten proces. Ponadto FMRP jest w wysokim stopniu obecny w neuronach (Schaeffer i wsp.,2003).

Innymi możliwościami regulowania ekspresji białek są obecne w kompleksach rybonukleoproteinowych (RNP) małe interferujące RNA (siRNAs) oraz mikroRNA (miRNA). Przyłączenie siRNA do jego docelowego RNA powoduje jego degradację, a miRNA mogą hamować translację poprzez cięcie mRNA na dwie nici, destabilizowanie mRNA przez skracanie końca poli(A) lub przez zmniejszenie wydajności rybosomów (Olsen i Ambros, 1999; Zeng i wsp.,2002).

By zbadać czy istnieją ewentualne powiązania między FMRP lub mikroRNA z kanałami TRP niezbędne jest przeprowadzenie nowych badań.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie analizy przedstawionych w tej pracy doktorskiej wysunięto następujące wnioski:

- Długotrwała amnezja obserwowana po zahamowanie aktywacji kanałów TRP po podaniu ich antagonistów (SKF 96365 lub 2-APB) bezpośrednio po treningu lub przypomnieniu wskazuje na ważną rolę tych kanałów w procesach formowania pamięci.
- Amnezja obserwowana po podaniu SKF 96365 lub 2-APB w różnych czasach treningu lub po przypomnieniu treningu wskazuje, że kanały TRP zaangażowane są również w procesy przypominania wcześniej nabytych informacji.
- Zniesienie amnestycznego działania antagonistów mGluR1 i mGluR5 przez aktywację kanałów TRP oraz brak takiego efektu w przypadku aktywacji mGluR1/5 przy równoczesnym zablokowaniu kanałów TRP wskazuje na kluczową rolę sygnału wapniowego generowanego przez te kanały w formowaniu pamięci.
- Porównanie amnezyjnego działania niespecyficznego inhibitora kanałów TRP, SKF 96365 i 2-APB, oraz specyficznego blokowania wybranych kanałów odpowiednimi przeciwciałami wskazuje, że wszystkie z badanych kanałów (TRPV1, TRPV3 oraz TRPC3) są zaangażowane w procesy formowania pamięci.
- Zaobserwowane obniżenie w porównaniu do kontroli, ekspresji wybranych białek zaangażowanych w procesy formowania pamięci (NCAM, CaMKII) po zablokowaniu kanałów TRP bezpośrednio po treningu lub przypomnieniu sugeruje, że generowany przez pobudzenie tych kanałów sygnał wapniowy jest ważnym elementem zarówno konsolidacji jak i rekonsolidacji pamięci.

Przedstawione powyżej obserwacje, prowadzone na modelu unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt, pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że aktywacja kanałów TRP i generowany w ten sposób napływ jonów wapnia do wnętrza neuronów są kluczowym elementem wewnątrzkomórkowych procesów zapamiętywania. Kanały TRP biorą udział nie tylko w konsolidacji i prawdopodobnie w rekonsolidacji pamięci, ale także w procesach przypominania wcześniej zapamiętanych informacji. Te wnioski sugerują, że możliwość manipulowania aktywnością kanałów TRP może stać się narzędziem w leczeniu chorób związanych z utratą pamięci lub upośledzeniem uczenia się i zapamiętywania.

Bibliografia

- Alberini, C.M., 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00012>
- Alberini, C.M., Kandel, E.R., 2014. The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a021741. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021741>
- Abrecht, A., Bergato-Acosta, J.C., Pape, H-C., Stork, O. 2010. Role of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in amygdalo-hippocampal interactions and salience determination of contextual memory. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13(5), 661-674
- Alexander, S.P.H., Benson, H.E., Faccenda, E., Pawson, A.J., Sharman, J.L., McGrath, J.C., Catterall, W.A., Spedding, M., Peters, J.A., Harmar, A.J., CGTP Collaborators, 2013. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Overview: Overview. *Br. J. Pharmacol.* 170, 1449–1458. <https://doi.org/10.1111/bph.12444>
- Ali, S.M., Bullock, S., Rose, S.P.R., 1988. Phosphorylation of Synaptic Proteins in Chick Forebrain: Changes with Development and Passive Avoidance Training. *J. Neurochem.* 50, 1579–1587. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb03047.x>
- Almaguer, W., Estupiñán, B., Uwe Frey, J., Bergado, J.A., 2002. Aging impairs amygdala-hippocampus interactions involved in hippocampal LTP. *Neurobiol. Aging* 23, 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00278-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00278-0)
- Andrew, R.J., Johnston, A.N.B., Robins, A., Rogers, L.J., 2004. Light experience and the development of behavioural lateralisation in chicks. *Behav. Brain Res.* 155, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.016>
- Anokhin, K.V., Rose, S.P., 1991. Learning-induced increase of immediate early gene messenger RNA in the chick forebrain. *Eur. J. Neurosci.* 3(2), 162-167
- Anokhin, K.V., Tiunova, A.A., Rose, S.P.R., 2002. Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1759–1765. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02023.x>
- Ardiel, E.L., Rankin, C.H., 2010. An elegant mind: learning and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 17, 191–201. <https://doi.org/10.1101/lm.960510>
- Asakawa, M., Yoshioka, T., Matsutani, T., Hikita, I., Suzuki, M., Oshima, I., Tsukahara, K., Arimura, A., Horikawa, T., Hirasawa, T., Sakata, T., 2006. Association of a Mutation in TRPV3 with Defective

- Hair Growth in Rodents. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2664–2672.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700468>
- Back, F.P., Carobrez, A.P., 2018. Periaqueductal gray glutamatergic, cannabinoid and vanilloid receptor interplay in defensive behavior and aversive memory formation. *Neuropharmacology* 135, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.03.032>
- Baddeley, A.D., Kopelman, M.D., Wilson, B.A., 2003. *The Handbook of Memory Disorders*.
- Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1993. Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 397–426. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.002145>
- Baker, K.D., Edwards, T.M., Rickard, N.S., 2013. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 1211–1239.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.011>
- Barker, G.R.I., Warburton, E.C., 2008. NMDA receptor plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices is crucial for the acquisition of long-term object-in-place associative memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2837–2844. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4447-07.2008>
- Barria, A., Derkach, V., Soderling, T., 1997. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 32727–32730.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.32727>
- Bateson, P.P.G., 1966. THE CHARACTERISTICS AND CONTEXT OF IMPRINTING. *Biol. Rev.* 41, 177–217.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1966.tb01489.x>
- Batish, M., van den Bogaard, P., Kramer, F.R., Tyagi, S., 2012. Neuronal mRNAs travel singly into dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 4645–4650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111226109>
- Battaglia, G., Bruno, V., Pisani, A., Centonze, D., Catania, M.V., Calabresi, P., Nicoletti, F., 2001. Selective blockade of type-1 metabotropic glutamate receptors induces neuroprotection by enhancing gabaergic transmission. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 1071–1083.
<https://doi.org/10.1006/mcne.2001.0992>
- Bencze, M., Behuliak, M., Vavřínová, A., Zicha, J., 2015. Broad-range TRP channel inhibitors (2-APB, flufenamic acid, SKF-96365) affect differently contraction of resistance and conduit femoral arteries of rat. *Eur. J. Pharmacol.* 765, 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.014>
- Benito, E., Barco, A., 2015. The neuronal activity-driven transcriptome. *Mol. Neurobiol.* 51, 1071–1088.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8772-z>
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Bezzides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., Clapham, D.E., 2004. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell Biol.* 6, 709–720. <https://doi.org/10.1038/ncb1150>

- Bhattacharyya, S., 2016. Inside story of Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 77, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.03.003>
- Bianchin, M., Mello e Souza, T., Medina, J.H., Izquierdo, I., 1999. The Amygdala Is Involved in the Modulation of Long-Term Memory, but Not in Working or Short-Term Memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 71, 127–131. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3881>
- Bisaz, R., Conboy, L., Sandi, C., 2009. Learning under stress: A role for the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.11.003>
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bolhuis, J.J., 2000. *Brain, Perception, Memory Advances in Cognitive Neuroscience*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198524823.001.0001>
- Bolhuis, J.J., 1991. Mechanisms of avian imprinting: a review. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 66, 303–345. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1991.tb01145.x>
- Bollimuntha, S., Selvaraj, S., Singh, B.B., 2011. Emerging roles of canonical TRP channels in neuronal function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 573–593. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_31
- Bovet-Carmona, M., Menigoz, A., Pinto, S., Tambuyzer, T., Krautwald, K., Voets, T., Aerts, J.-M., Angenstein, F., Vennekens, R., Balschun, D., 2018. Disentangling the role of TRPM4 in hippocampus-dependent plasticity and learning: an electrophysiological, behavioral and FMRI approach. *Brain Struct. Funct.* 223, 3557–3576. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1706-1>
- Bröker-Lai, J., Kollwe, A., Schindeldecker, B., Pohle, J., Nguyen Chi, V., Mathar, I., Guzman, R., Schwarz, Y., Lai, A., Weißgerber, P., Schwegler, H., Dietrich, A., Both, M., Sprengel, R., Draguhn, A., Köhr, G., Fakler, B., Flockerzi, V., Bruns, D., Freichel, M., 2017. Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *EMBO J.* 36, 2770–2789. <https://doi.org/10.15252/embj.201696369>
- Brown, T.E., Chirila, A.M., Schrank, B.R., Kauer, J.A., 2013. Loss of interneuron LTD and attenuated pyramidal cell LTP in *Trpv1* and *Trpv3* KO mice: TRPV Channels and LTD in Hippocampal Interneurons. *Hippocampus* 23, 662–671. <https://doi.org/10.1002/hipo.22125>
- Burchuladze, R., Potter, J., Rose, S.P.R., 1990. Memory formation in the chick depends on membrane-bound protein kinase C. *Brain Res.* 535, 131–138. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91831-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91831-Z)
- Cao, X., Cui, Z., Feng, R., Tang, Y.-P., Qin, Z., Mei, B., Tsien, J.Z., 2007. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1815–1822. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05431.x>

- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chen, A., Hu, W.W., Jiang, X.L., Potegal, M., Li, H., 2017. Molecular mechanisms of group I metabotropic glutamate receptor mediated LTP and LTD in basolateral amygdala in vitro. *Psychopharmacology (Berl.)* 234, 681–694. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4503-7>
- Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., Morris, R.G., 2000. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 975–979. <https://doi.org/10.1038/35050103>
- Cheng, W., Sun, C., Zheng, J., 2010. Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell* 1, 802–810. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0108-9>
- Cherkin, A., 1969. Kinetics of memory consolidation: role of amnesic treatment parameters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 63, 1094–1101. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.4.1094>
- Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strübing, C., 2001. The trp ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 387–396. <https://doi.org/10.1038/35077544>
- Conboy, L., Bisaz, R., Markram, K., Sandi, C., 2010. Role of NCAM in emotion and learning. *Adv. Exp. Med. Biol.* 663, 271–296. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1170-4_18
- Cosens, D.J., Manning, A., 1969. Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224, 285–287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>
- Coultrap, S.J., Bayer, K.U., 2012. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* 35, 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.05.003>
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., Barthels, D., Rajewsky, K., Wille, W., 1994. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455–459. <https://doi.org/10.1038/367455a0>
- Crowe, S.F., Sherry, J.M., Hale, M.W., 2008. Remembering that things have changed: a review of the cellular mechanisms of memory re-consolidation in the day-old chick. *Brain Res. Bull.* 76, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.02.020>
- Csillag, A., 1999. Striato-telencephalic and striato-tegmental circuits: relevance to learning in domestic chicks. *Behav. Brain Res.* 98, 227–236. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(98\)00088-6](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(98)00088-6)
- Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., Edelman, G.M., 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface

- modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799–806. <https://doi.org/10.1126/science.3576199>
- Daisley, J.N., Gruss, M., Rose, S.P.R., Braun, K., 1998. Passive Avoidance Training and Recall are Associated With Increased Glutamate Levels in the Intermediate Medial Hyperstriatum Ventrale of the Day-Old Chick. *Neural Plast.* 6, 53–61. <https://doi.org/10.1155/NP.1998.53>
- Daisley, Jonathan.N., Rose, Steven.P.R., 1994. The affect of a passive avoidance task on the release of amino acids in vitro from the left Intermediate Medial Hyperstriatum Ventrale (IMHV) of the day-old chick. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 160S-160S. <https://doi.org/10.1042/bst022160s>
- Davis, H.P., Squire, L.R., 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96, 518–559.
- De Clercq, K., Vriens, J., 2018. Establishing life is a calcium-dependent TRiP: Transient receptor potential channels in reproduction. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1865, 1815–1829. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.005>
- De March, Z., Giampà, C., Patassini, S., Bernardi, G., Fusco, F.R., 2006. Cellular localization of TRPC5 in the substantia nigra of rat. *Neurosci. Lett.* 402, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.061>
- Dennis, T.S., Perrotti, L.I., 2015. Erasing Drug Memories Through the Disruption of Memory Reconsolidation: A Review of Glutamatergic Mechanisms: Erasing Drug Memories Through Disruption. *J. Appl. Biobehav. Res.* 20, 101–129. <https://doi.org/10.1111/jabr.12031>
- D'Eustachio, P., Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1985. Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7631–7635. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.22.7631>
- Diergaarde, L., Schoffelmeer, A.N.M., De Vries, T.J., 2008. Pharmacological manipulation of memory reconsolidation: Towards a novel treatment of pathogenic memories. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 453–457. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.010>
- Diver, J.M., Sage, S.O., Rosado, J.A., 2001. The inositol trisphosphate receptor antagonist 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) blocks Ca²⁺ entry channels in human platelets: cautions for its use in studying Ca²⁺ influx. *Cell Calcium* 30, 323–329. <https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0239>
- Doyle, E., Nolan, P.M., Bell, R., Regan, C.M., 1992. Intraventricular Infusions of Anti-Neural Cell Adhesion Molecules in a Discrete Posttraining Period Impair Consolidation of a Passive Avoidance Response in the Rat. *J. Neurochem.* 59, 1570–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08477.x>
- Drachman, D.A., Arbit, J., 1966. Memory and the hippocampal complex. II. Is memory a multiple process? *Arch. Neurol.* 15, 52–61. <https://doi.org/10.1001/archneur.1966.00470130056005>

- Du, L.-L., Wang, L., Yang, X.-F., Wang, P., Li, X.-H., Chai, D.-M., Liu, B.-J., Cao, Y., Xu, W.-Q., Liu, R., Tian, Q., Wang, J.-Z., Zhou, X.-W., 2017. Transient Receptor Potential-canonical 1 is Essential for Environmental Enrichment-Induced Cognitive Enhancement and Neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* 54, 1992–2002. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9758-9>
- Du, Y., Fu, M., Huang, Z., Tian, X., Li, J., Pang, Y., Song, W., Tian Wang, Y., Dong, Z., 2020. TRPV1 activation alleviates cognitive and synaptic plasticity impairments through inhibiting AMPAR endocytosis in APP23/PS45 mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 19, e13113. <https://doi.org/10.1111/accel.13113>
- Dudai, Y., 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150500>
- Dudai, Y., 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Edelman, G.M., 1984. Modulation of cell adhesion during induction, histogenesis, and perinatal development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 339–377. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.002011>
- Eichenbaum, H., 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 41–50. <https://doi.org/10.1038/35036213>
- Fields, R.D., Itoh, K., 1996. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19, 473–480. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)30013-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)30013-1)
- Firman, J.D., Kuenzel, W.J., 1988. Neuroanatomical regions of the chick brain involved in monitoring amino acid deficient diets. *Brain Res. Bull.* 21, 637–642. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(88\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(88)90203-1)
- Freeman, F.M., Rose, S.P., 1999. Expression of Fos and Jun proteins following passive avoidance training in the day-old chick. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 6, 389–397.
- Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E., Muller, D., 1993. Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 268, 7863–7867.
- Fusco, F.R., Martorana, A., Giampà, C., March, Z.D., Vacca, F., Tozzi, A., Longone, P., Piccirilli, S., Paolucci, S., Sancesario, G., Mercuri, N.B., Bernardi, G., 2004. Cellular localization of TRPC3 channel in rat brain: preferential distribution to oligodendrocytes. *Neurosci. Lett.* 365, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.070>
- Gavva, N.R., Bannon, A.W., Surapaneni, S., Hovland, D.N., Lehto, S.G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., Kuang, R., Le, A., Tamir, R., Wang, J., Youngblood, B., Zhu, D., Norman, M.H., Magal, E., Treanor, J.J.S., Louis, J.-C., 2007. The Vanilloid Receptor TRPV1 Is Tonicly Activated

- In Vivo and Involved in Body Temperature Regulation. *J. Neurosci.* 27, 3366–3374.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4833-06.2007>
- Ge, R., Tai, Y., Sun, Y., Zhou, K., Yang, S., Cheng, T., Zou, Q., Shen, F., Wang, Y., 2009. Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett.* 283, 43–51.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.023>
- Gee, C.E., Benquet, P., Gerber, U., 2003. Group I metabotropic glutamate receptors activate a calcium-sensitive transient receptor potential-like conductance in rat hippocampus. *J. Physiol.* 546, 655–664. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.032961>
- Genro, B.P., de Oliveira Alvares, L., Quillfeldt, J.A., 2012. Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.01.002>
- Giampà, C., DeMarch, Z., Patassini, S., Bernardi, G., Fusco, F.R., 2007. Immunohistochemical localization of TRPC6 in the rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 424, 170–174.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.07.049>
- Gieros, K., Sobczuk, A., Salinska, E., 2012. Differential involvement of mGluR1 and mGluR5 in memory reconsolidation and retrieval in a passive avoidance task in 1-day old chicks. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.11.004>
- Gisquet-Verrier, P., Riccio, D.C., 2018. Memory integration: An alternative to the consolidation/reconsolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol.* 171, 15–31.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.10.002>
- Graham, K.S., Barense, M.D., Lee, A.C.H., 2010. Going beyond LTM in the MTL: a synthesis of neuropsychological and neuroimaging findings on the role of the medial temporal lobe in memory and perception. *Neuropsychologia* 48, 831–853.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.01.001>
- Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., Clapham, D.E., 2003. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat. Neurosci.* 6, 837–845.
<https://doi.org/10.1038/nn1092>
- Groenen, M.A., Cheng, H.H., Bumstead, N., Benkel, B.F., Briles, W.E., Burke, T., Burt, D.W., Crittenden, L.B., Dodgson, J., Hillel, J., Lamont, S., de Leon, A.P., Soller, M., Takahashi, H., Vignal, A., 2000. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Res.* 10, 137–147.
<https://doi.org/10.1101/gr.10.1.137>
- Guilak, F., Leddy, H.A., Liedtke, W., 2010. Transient receptor potential vanilloid 4: The sixth sense of the musculoskeletal system? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 404–409.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05389.x>

- Guo, S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 3, 63–74. <https://doi.org/10.1046/j.1601-183x.2003.00053.x>
- Harteneck, C., Gollasch, M., 2011. Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 35–41. <https://doi.org/10.2174/138920111793937943>
- Harteneck, C., Klose, C., Krautwurst, D., 2011. Synthetic Modulators of TRP Channel Activity, in: Islam, Md.S. (Ed.), *Transient Receptor Potential Channels*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 87–106. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_4
- Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H.A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., Konnerth, A., 2008. TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination. *Neuron* 59, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.009>
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., Malinow, R., 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262–2267. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2262>
- He, K., Qi, F., Guo, C., Zhan, S., Xu, H., Liu, J., Yang, X., 2016. Movement deficits and neuronal loss in basal ganglia in TRPC1 deficient mice. *Oncotarget* 7, 69337–69346. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12567>
- Horn, G., 2004. Pathways of the past: the imprint of memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 108–120. <https://doi.org/10.1038/nrn1324>
- Hu, H.-Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C.K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L.-Y., Wood, J.D., Zhu, M.X., 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Is a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J. Biol. Chem.* 279, 35741–35748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404164200>
- Hutson, M.R., Keyte, A.L., Hernández-Morales, M., Gibbs, E., Kupchinsky, Z.A., Argyridis, I., Erwin, K.N., Pegram, K., Kneifel, M., Rosenberg, P.B., Matak, P., Xie, L., Grandl, J., Davis, E.E., Katsanis, N., Liu, C., Benner, E.J., 2017. Temperature-activated ion channels in neural crest cells confer maternal fever-associated birth defects. *Sci. Signal.* 10, eaal4055. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4055>
- Hwei Ling Ong, Lorena Brito de Souza, Indu S. Ambudkar, 2016. Role of TRPC Channels in Store-Operated Calcium Entry, in: *Calcium Entry Pathways in Non-Excitable Cells*. pp. 87–109.
- Gisquet-Verrier P., Riccio D.C. 2018 Memory integration: An alternative to the consolidation/reconsolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 171:15-31
- Igaz, L.M., Bekinschtein, P., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2004. One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKII α , Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. *Mol. Brain Res.* 132, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.08.016>

- Imura, K., Yoshioka, T., Hirasawa, T., Sakata, T., 2009. Role of TRPV3 in immune response to development of dermatitis. *J. Inflamm.* 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-6-17>
- Islam, M.S. (Ed.), 2011. Transient receptor potential channels, *Advances in experimental medicine and biology*. Springer, Dordrecht.
- Jia, Y., Zhou, J., Tai, Y., Wang, Y., 2007. TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat. Neurosci.* 10, 559–567. <https://doi.org/10.1038/nn1870>
- Jonides, J., Lewis, R.L., Nee, D.E., Lustig, C.A., Berman, M.G., Moore, K.S., 2008. The mind and brain of short-term memory. *Annu. Rev. Psychol.* 59, 193–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093615>
- Jordt, S.-E., Julius, D., 2002. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 108, 421–430. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00637-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00637-2)
- Kaneko, Y., Szallasi, A., 2014. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective: Clinical perspective on TRPs. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2474–2507. <https://doi.org/10.1111/bph.12414>
- Kanzaki, M., Zhang*, Y.-Q., Mashima*, H., Li*, L., Shibata*, H., Kojima, I., 1999. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat. Cell Biol.* 1, 165–170. <https://doi.org/10.1038/11086>
- Kauer, J.A., Gibson, H.E., 2009. Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends Neurosci.* 32, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.006>
- Kim, J., Kwon, J.-T., Kim, H.-S., Josselyn, S.A., Han, J.-H., 2014. Memory recall and modifications by activating neurons with elevated CREB. *Nat. Neurosci.* 17, 65–72. <https://doi.org/10.1038/nn.3592>
- Kiss, J.Z., Muller, D., 2001. Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev. Neurosci.* 12, 297–310. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2001.12.4.297>
- Kiss, J.Z., Troncoso, E., Djebbara, Z., Vutskits, L., Muller, D., 2001. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36, 175–184. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00093-5](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00093-5)
- Kossut, M., Rose, S.P.R., 1984. Differential 2-deoxyglucose uptake into chick brain structures during passive avoidance training. *Neuroscience* 12, 971–977. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90184-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90184-2)
- Krolik, A., Diamandakis, D., Zych, A., Stafiej, A., Salinska, E., 2020. The involvement of TRP channels in memory formation and task retrieval in a passive avoidance task in one-day old chicks. *Neurobiol. Learn. Mem.* 171, 107209. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107209>
- Laricchiuta, D., Centonze, D., Petrosini, L., 2013. Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. *Behav. Brain Res.* 256, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.010>

- Lemonnier, L., Trebak, M., Putney, J.W., 2008. Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channel subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Cell Calcium* 43, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.09.001>
- Lenart, J., Kogut, K., Salinska, E., 2017. Lateralization of housekeeping genes in the brain of one-day old chicks. *Gene Expr. Patterns* 25–26, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2017.06.006>
- Lepannetier, S., Gualdani, R., Tempesta, S., Schakman, O., Seghers, F., Kreis, A., Yerna, X., Slimi, A., de Clippele, M., Tajeddine, N., Voets, T., Bon, R.S., Beech, D.J., Tissir, F., Gailly, P., 2018. Activation of TRPC1 Channel by Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Modulates Synaptic Plasticity and Spatial Working Memory. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 318. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00318>
- Leung, Y.M., Kwan, C.Y., 1999. Current Perspectives in the Pharmacological Studies of Store-Operated Ca²⁺ Entry Blockers. *Jpn. J. Pharmacol.* 81, 253–258. <https://doi.org/10.1254/jjp.81.253>
- Li, M., Chen, C., Zhou, Z., Xu, S., Yu, Z., 2012. A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca²⁺ entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Cell Calcium* 51, 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.014>
- Li, Y., Jia, Y.-C., Cui, K., Li, N., Zheng, Z.-Y., Wang, Y., Yuan, X., 2005. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434, 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature03477>
- Liedtke, M., PH.D., Wolfgang B. (Ed.), 2006. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades, 0 ed. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420005844>
- Lindy, A.S., Parekh, P.K., Zhu, R., Kanju, P., Chintapalli, S.V., Tsvilovskyy, V., Patterson, R.L., Anishkin, A., van Rossum, D.B., Liedtke, W.B., 2014. TRPV channel-mediated calcium transients in nociceptor neurons are dispensable for avoidance behaviour. *Nat. Commun.* 5, 4734. <https://doi.org/10.1038/ncomms5734>
- Lisman, J., 2003. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358, 829–842. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1242>
- Lisman, J., Schulman, H., Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190. <https://doi.org/10.1038/nrn753>
- Lisman, J., Yasuda, R., Raghavachari, S., 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 1(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 25(4), 402-408
- Lucchesi, W., Mizuno, K., Giese, K.P., 2011. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Res. Bull.* 85, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.10.009>

- Lüthi, A., Laurent, J.-P., Figurovt, A., Mullert, D., Schachnert, M., 1994. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372, 777–779. <https://doi.org/10.1038/372777a0>
- Majewski, L., Kuznicki, J., 2015. SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 1940–1952. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.019>
- Malenka, R.C., 1999. Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science* 285, 1870–1874. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1870>
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A., Waxham, M.N., 1989. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340, 554–557. <https://doi.org/10.1038/340554a0>
- Mammen, A.L., Kameyama, K., Roche, K.W., Huganir, R.L., 1997. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Biol. Chem.* 272, 32528–32533. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32528>
- Maness, P.F., Schachner, M., 2007. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10, 19–26. <https://doi.org/10.1038/nn1827>
- Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kossel, M., Holsboer, F., Zieglgansberger, W., Landgraf, R., Lutz, B., Wotjak, C.T., 2007. Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice. *J. Neurosci.* 27, 832–839. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3303-06.2007>
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 649–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
- Martorana, A., Giampà, C., DeMarch, Z., Viscomi, M.T., Patassini, S., Sancesario, G., Bernardi, G., Fusco, F.R., 2006. Distribution of TRPC1 receptors in dendrites of rat substantia nigra: a confocal and electron microscopy study. *Eur. J. Neurosci.* 24, 732–738. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04932.x>
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., Mikoshiba, K., 1997. 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl Borate, a Membrane-Penetrable Modulator of Ins(1,4,5)P₃-Induced Ca²⁺ Release. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 498–505. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021780>
- Matsushima, T., Izawa, E.-I., Aoki, N., Yanagihara, S., 2003. The Mind Through Chick Eyes : Memory, Cognition and Anticipation. *Zoolog. Sci.* 20, 395–408. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.395>
- Mayford, M., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., 2012. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005751>

- Ménard, C., Quirion, R., 2012. Group 1 Metabotropic Glutamate Receptor Function and Its Regulation of Learning and Memory in the Aging Brain. *Front. Pharmacol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00182>
- Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benham, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E., Rink, T.J., 1990. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.* 271, 515–522.
- Mileusnic, R., Lancashire, C., Rose, S.P., 1999. Sequence-specific impairment of memory formation by NCAM antisense oligonucleotides. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 6, 120–127.
- Miller, S.G., Kennedy, M.B., 1986. Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca²⁺-triggered molecular switch. *Cell* 44, 861–870. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90008-5)
- Milner, B., 1972. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin. Neurosurg.* 19, 421–446. https://doi.org/10.1093/neurosurgery/19.cn_suppl_1.421
- Minke, B., 2010. The History of the *Drosophila* TRP Channel: The Birth of a New Channel Superfamily. *J. Neurogenet.* 24, 216–233. <https://doi.org/10.3109/01677063.2010.514369>
- Miranda, M., Bekinschtein, P., 2018. Plasticity Mechanisms of Memory Consolidation and Reconsolidation in the Perirhinal Cortex. *Neuroscience* 370, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.002>
- Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J., 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160, 554–555. <https://doi.org/10.1126/science.160.3827.554>
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., Kimberling, W.J., Breuning, M.H., Deltas, C.C., Peters, D.J., Somlo, S., 1996. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339–1342. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1339>
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., 2002. The TRP Channels, a Remarkably Functional Family. *Cell* 108, 595–598. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00670-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00670-0)
- Montell, C., Rubin, G.M., 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313–1323.
- Moqrich, A., 2005. Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science* 307, 1468–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1108609>
- Moran, M.M., McAlexander, M.A., Bíró, T., Szallasi, A., 2011. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 601–620. <https://doi.org/10.1038/nrd3456>
- Morelli, M.B., Amantini, C., Liberati, S., Santoni, M., Nabissi, M., 2013. TRP channels: new potential therapeutic approaches in CNS neuropathies. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 12, 274–293.

- Morey, R.A., Gold, A.L., LaBar, K.S., Beall, S.K., Brown, V.M., Haswell, C.C., Nasser, J.D., Wagner, H.R., McCarthy, G., Mid-Atlantic MIRECC Workgroup, 2012. Amygdala volume changes in posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veterans group. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 1169–1178. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.50>
- Morgan, A.J., Jacob, R., 1994. Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.* 300, 665–672. <https://doi.org/10.1042/bj3000665>
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
- Morris, R.G.M., 2013. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* 74, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.014>
- Moser, M.B., Trommald, M., Andersen, P., 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12673–12675. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12673>
- Moussaieff, A., Rimmerman, N., Bregman, T., Straiker, A., Felder, C.C., Shoham, S., Kashman, Y., Huang, S.M., Lee, H., Shohami, E., Mackie, K., Caterina, M.J., Walker, J.M., Fride, E., Mechoulam, R., 2008. Incensole acetate, an incense component, elicits psychoactivity by activating TRPV3 channels in the brain. *FASEB J.* 22, 3024–3034. <https://doi.org/10.1096/fj.07-101865>
- Mulier, M., Vriens, J., Voets, T., 2017. TRP channel pores and local calcium signals. *Cell Calcium* 66, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.04.007>
- Müller, G.E., Pilzecker, A., 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z Psychol Ergänzungsband* 1, 1–300.
- Nader, K., Hardt, O., 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(3), 224–234
- Nader, K., Schafe, G.E., Le Doux, J.E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Nagy, I., Sántha, P., Jancsó, G., Urbán, L., 2004. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 351–369. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.037>
- Nesin, V., Tsiokas, L., 2014. TRPC1, in: Nilius, B., Flockerzi, V. (Eds.), *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 15–51. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_2
- Neuner, S.M., Wilmott, L.A., Hope, K.A., Hoffmann, B., Chong, J.A., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., O'Connell, K.M., Tryba, A.K., Greene, A.S., Savio Chan, C., Kaczorowski, C.C., 2015. TRPC3

- channels critically regulate hippocampal excitability and contextual fear memory. *Behav. Brain Res.* 281, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.018>
- Nguyen, C., Mattei, M.G., Mattei, J.F., Santoni, M.J., Goridis, C., Jordan, B.R., 1986. Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J. Cell Biol.* 102, 711–715. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.3.711>
- Nieto-Posadas, A., Jara-Oseguera, A., Rosenbaum, T., 2011. TRP channel gating physiology. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2131–2150.
- Nilius, B., 2013. Transient receptor potential TRP channels as therapeutic drug targets: next round! *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 244–246.
- Nilius, B., Appendino, G., 2013. Spices: The Savory and Beneficial Science of Pungency, in: Nilius, B., Amara, S.G., Lill, R., Offermanns, S., Gudermann, T., Petersen, O.H., Jahn, R. (Eds.), *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 164. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–76. https://doi.org/10.1007/112_2013_11
- Ohashi, Shiina, 2020. Cataloguing and Selection of mRNAs Localized to Dendrites in Neurons and Regulated by RNA-Binding Proteins in RNA Granules. *Biomolecules* 10, 167. <https://doi.org/10.3390/biom10020167>
- Olsen, P.H., Ambros, V., 1999. The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Dev. Biol.* 216, 671–680. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9523>
- Otmakhov, N., Griffith, L.C., Lisman, J.E., 1997. Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 5357–5365.
- Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1987. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 294–298. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.294>
- Pan, J.P., Zhang, H.Q., Wei-Wang, Guo, Y.F., Na-Xiao, Cao, X.H., Liu, L.J. 2011 Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhanced spatial memory in rats. *Brain Res.* 1412:18-27. doi: 10.1016/j.brainres.2011.07.015
- Parekh, A.B., Putney, J.W., 2005. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 85, 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Passafaro, M., Piëch, V., Sheng, M., 2001. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 917–926. <https://doi.org/10.1038/nn0901-917>

- Patapoutian, A., Tate, S., Woolf, C.J., 2009. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 55–68. <https://doi.org/10.1038/nrd2757>
- Patterson, T.A., Rose, S.P., 1992. Memory in the chick: Multiple cues, distinct brain locations. *Behav. Neurosci.* 106, 465–470. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.3.465>
- Paz, R., Bauer, E.P., Paré, D., 2007. Learning-related facilitation of rhinal interactions by medial prefrontal inputs. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 6542–6551. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1077-07.2007>
- Pedersen, S.F., Nilius, B., 2007. Transient Receptor Potential Channels in Mechanosensing and Cell Volume Regulation, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 183–207. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28010-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28010-3)
- Peier, A.M., 2002. A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science* 296, 2046–2049. <https://doi.org/10.1126/science.1073140>
- Petersen, C.C., Berridge, M.J., Borgese, M.F., Bennett, D.L., 1995. Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem. J.* 311, 41–44. <https://doi.org/10.1042/bj3110041>
- Pinaud, R., Terleph, T.A., 2008. A songbird forebrain area potentially involved in auditory discrimination and memory formation. *J. Biosci.* 33, 145–155. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0030-y>
- Pingle, S.C., Matta, J.A., Ahern, G.P., 2007. Capsaicin Receptor: TRPV1 A Promiscuous TRP Channel, in: Flockerzi, V., Nilius, B. (Eds.), *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 155–171. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_9
- Pollerberg, G.E., Burridge, K., Krebs, K.E., Goodman, S.R., Schachner, M., 1987. The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res.* 250, 227–236. <https://doi.org/10.1007/BF00214676>
- Prakriya, M., Lewis, R.S., 2001. Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyl-diphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J. Physiol.* 536, 3–19. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00003.x>
- Putney, J.W., 2010. Pharmacology of store-operated calcium channels. *Mol. Interv.* 10, 209–218. <https://doi.org/10.1124/mi.10.4.4>
- Ramsey, I.S., Delling, M., Clapham, D.E., 2006. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
- Ranganath, C., Blumenfeld, R.S., 2005. Doubts about double dissociations between short- and long-term memory. *Trends Cogn. Sci.* 9, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2005.06.009>
- Reboreda, A., Jiménez-Díaz, L., Navarro-López, J.D., 2011. TRP channels and neural persistent activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 595–613. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_32

- Reiner, A., Perkel, D.J., Bruce, L.L., Butler, A.B., Csillag, A., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Shimizu, T., Striedter, G., Wild, M., Ball, G.F., Durand, S., Güntürkün, O., Lee, D.W., Mello, C.V., Powers, A., White, S.A., Hough, G., Kubikova, L., Smulders, T.V., Wada, K., Dugas-Ford, J., Husband, S., Yamamoto, K., Yu, J., Siang, C., Jarvis, E.D., Güntürkün, O., Avian Brain Nomenclature Forum, 2004. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J. Comp. Neurol.* 473, 377–414. <https://doi.org/10.1002/cne.20118>
- Riccio D.C, Moody E.W., Millin P.M. 2002 Reconsolidation reconsidered. *Integr Physiol Behav Sci.* 37(4):245-53
- Riccio, A., Medhurst, A.D., Mattei, C., Kelsell, R.E., Calver, A.R., Randall, A.D., Benham, C.D., Pangalos, M.N., 2002. mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Mol. Brain Res.* 109, 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00527-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00527-2)
- Richter-Levin, G., Akirav, I., 2000. Amygdala-Hippocampus Dynamic Interaction in Relation to Memory. *Mol. Neurobiol.* 22, 011–020. <https://doi.org/10.1385/MN:22:1-3:011>
- Rohacs, T., 2015. Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 467, 1851–1869. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1695-3>
- Romano, A., Locatelli, F., Freudenthal, R., Merlo, E., Feld, M., Ariel, P., Lemos, D., Federman, N., Fustiñana, M.S., 2006. Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of *Chasmagnathus*. *Biol. Bull.* 210, 280–288. <https://doi.org/10.2307/4134564>
- Rønn, L.C.B., Berezin, V., Bock, E., 2000. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(99\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(99)00088-X)
- Rønn, L.C.B., Bock, E., Linnemann, D., Jahnsen, H., 1995. NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res.* 677, 145–151. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00147-I](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00147-I)
- Rose, S.P.R., 2000. God's Organism? The Chick as a Model System for Memory Studies. *Learn. Mem.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.1101/lm.7.1.1>
- Rose, S.P.R., 1995. Glycoproteins and memory formation. *Behav. Brain Res.* 66, 73–78. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)00127-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)00127-2)
- Rose, S.P.R., Csillag, A., 1985. Passive avoidance training results in lasting changes in deoxyglucose metabolism in left hemisphere regions of chick brain. *Behav. Neural Biol.* 44, 315–324. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(85\)90324-3](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(85)90324-3)
- Rose, S.P.R., Harding, S., 1984. Training increases [³H]fucose incorporation in chick brain only if followed by memory storage. *Neuroscience* 12, 663–667. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90081-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90081-2)

- Rusakov, D.A., Davies, H.A., Krivko, I.M., Stewart, M.G., Schachner, M., 1994. Training in chicks alters PSA-N-CAM distribution in forebrain cell membranes: *NeuroReport* 5, 2469–2473. <https://doi.org/10.1097/00001756-199412000-00016>
- Rutishauser, U., Jessell, T.M., 1988. Cell adhesion molecules in vertebrate neural development. *Physiol. Rev.* 68, 819–857. <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.3.819>
- Saito, S., Shingai, R., 2006. Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates. *Physiol. Genomics* 27, 219–230. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00322.2005>
- Salinska, E., 2006. The role of group I metabotropic glutamate receptors in memory consolidation and reconsolidation in the passive avoidance task in 1-day-old chicks. *Neurochem. Int.* 48, 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.11.015>
- Salinska, E., Bourne, R.C., Rose, S.P., 2001. Long-term memory formation in the chick requires mobilization of ryanodine-sensitive intracellular calcium stores. *Neurobiol. Learn Mem.* 75(3), 293–302
- Salinska, E., Bourne, R.C., Rose, S.P.R., 2004. Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3042–3047. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03407.x>
- Salinska, E.J., Chaudhury, D., Bourne, R.C., Rose, S.P., 1999. Passive avoidance training results in increased responsiveness of voltage- and ligand-gated calcium channels in chick brain synaptoneuroosomes. *Neuroscience* 93, 1507–1514. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00281-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00281-x)
- Sandi, C., Patterson, T.A., Rose, S.P., 1993. Visual input and lateralization of brain function in learning in the chick. *Neuroscience* 52, 393–401. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90166-d](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90166-d)
- Sandi, C., Rose, S.P.R., Mileusnic, R., Lancashire, C., 1995. Corticosterone facilitates long-term memory formation via enhanced glycoprotein synthesis. *Neuroscience* 69, 1087–1093. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00306-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00306-4)
- Sandi, C., Woodson, J.C., Haynes, V.F., Park, C.R., Touyarot, K., Lopez-Fernandez, M.A., Venero, C., Diamond, D.M., 2005. Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry* 57, 856–864. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.034>
- Sanhueza, M., Lisman, J., 2013. The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol. Brain* 6, 10. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-10>
- Santoni, M.J., Barthels, D., Barbas, J.A., Hirsch, M.R., Steinmetz, M., Goridis, C., Wille, W., 1987. Analysis of cDNA clones that code for the transmembrane forms of the mouse neural cell adhesion molecule (NCAM) and are generated by alternative RNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 15, 8621–8641. <https://doi.org/10.1093/nar/15.21.8621>

- Sara, S.J., 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* Cold Spring Harb. N 7, 73–84. <https://doi.org/10.1101/lm.7.2.73>
- Sarasa, M., Pesini, P., 2009. Natural Non-Transgenic Animal Models for Research in Alzheimers Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 6, 171–178. <https://doi.org/10.2174/156720509787602834>
- Sawamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., Mori, Y., Kaneko, S., 2017. TRP Channels in the Brain: What Are They There For?, in: Emir, T.L.R. (Ed.), *Neurobiology of TRP Channels*, *Frontiers in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Schachner, M., 1997. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 627–634. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80115-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80115-9)
- Schaeffer, C., Beaulande, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Moine, H., 2003. The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol. Cell* 95, 221–228. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00037-6)
- Schmidt, M., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A., 2009. Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane. *Neuron* 64, 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.030>
- Scholey, A.B., Mileusnic, R., Schachner, M., Rose, S.P., 1995. A role for a chicken homolog of the neural cell adhesion molecule L1 in consolidation of memory for a passive avoidance task in the chick. *Learn. Mem.* 2, 17–25. <https://doi.org/10.1101/lm.2.1.17>
- Scholey, A.B., Rose, S.P.R., Zamani, M.R., Bock, E., Schachner, M., 1993. A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis six hours following passive avoidance training of the young chick. *Neuroscience* 55, 499–509. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90519-L](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90519-L)
- Selvaraj, S., Sun, Y., Singh, B.B., 2010. TRPC channels and their implication in neurological diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 94–104. <https://doi.org/10.2174/187152710790966650>
- Semon, R., 2016. MNEME (CLASSIC REPRINT). FORGOTTEN Books, Place of publication not identified.
- Sherry, J.M., Milsome, S.L., Crowe, S.F., 2010. The roles of RNA synthesis and protein translation during reconsolidation of passive-avoidance learning in the day-old chick. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.10.006>
- Singh, A., Hildebrand, M.E., Garcia, E., Snutch, T.P., 2010. The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1464–1475. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00786.x>
- Singh, U., Kumar, S., Shelkar, G.P., Yadav, M., Kokare, D.M., Goswami, C., Lechan, R.M., Singru, P.S., 2016. Transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) in the ventral tegmental area of rat: Role in modulation of the mesolimbic-dopamine reward pathway. *Neuropharmacology* 110, 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.012>

- Skibo, G.G., Davies, H.A., Rusakov, D.A., Stewart, M.G., Schachner, M., 1997. Increased immunogold labelling of neural cell adhesion molecule isoforms in synaptic active zones of the chick striatum 5–6 hours after one-trial passive avoidance training. *Neuroscience* 82, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00382-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00382-5)
- Sluckin, W., 1972. Imprinting and early learning, 2. ed. ed, Methuen's manuals of modern psychology. Methuen, London.
- Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.-P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K.J., Smart, D., Randall, A.D., Anand, P., Davis, J.B., 2002. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186–190. <https://doi.org/10.1038/nature00894>
- Solomonias, R.O., Kotorashvili, A., Kiguradze, T., McCabe, B.J., Horn, G., 2005. Ca²⁺/calmodulin protein kinase II and memory: learning-related changes in a localized region of the domestic chick brain. *J. Physiol.* 569, 643–653. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098012>
- Solomonias, R.O., McCabe, B.J., 2015. Molecular mechanisms of memory in imprinting. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 50, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.09.013>
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99, 195–231. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.2.195>
- Squire, L.R., Clark, R.E., Knowlton, B.J., 2001. Retrograde amnesia. *Hippocampus* 11, 50–55. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<50::AID-HIPO1019>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<50::AID-HIPO1019>3.0.CO;2-G)
- Steele, R.J., Stewart, M.G., Rose, S.P.R., 1995. Increases in NMDA receptor binding are specifically related to memory formation for a passive avoidance task in the chick: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 674, 352–356. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00014-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00014-H)
- Steenland, H.W., Ko, S.W., Wu, L.-J., Zhuo, M., 2006. Hot Receptors in the Brain. *Mol. Pain* 2, 1744-8069-2–34. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-2-34>
- Stewart, M.G., Bourne, R.C., Steele, R.J., 1992. Quantitative Autoradiographic Demonstration of Changes in Binding to NMDA-sensitive [³H]Glutamate and [³H]MK801, but not [³H]AMPA Receptors in Chick Forebrain 30 min After Passive Avoidance Training. *Eur. J. Neurosci.* 4, 936–943. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00120.x>
- Stork, O., Welzl, H., 1999. Memory formation and the regulation of gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 55, 575–592. <https://doi.org/10.1007/s000180050316>
- Stork, O., Welzl, H., Wolfer, D., Schuster, T., Mantei, N., Stork, S., Hoyer, D., Lipp, H., Obata, K., Schachner, M., 2000. Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)

- null mutant mice through transgenic expression of NCAM180. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3291–3306.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00197.x>
- Sudhakaran, I.P., Ramaswami, M., 2017. Long-term memory consolidation: The role of RNA-binding proteins with prion-like domains. *RNA Biol.* 14, 568–586.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1244588>
- Summers, M.J., Crowe, S.F., Ng, K.T., 1997. Administration of dl-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) induces transient inhibition of reminder-activated memory retrieval in day-old chicks. *Cogn. Brain Res.* 5, 311–321. [https://doi.org/10.1016/S0926-6410\(97\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S0926-6410(97)00007-4)
- Tai, Y., Feng, S., Du, W., Wang, Y., 2009. Functional roles of TRPC channels in the developing brain. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 458, 283–289. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0618-y>
- Talman, V., Pascale, A., Jääntti, M., Amadio, M., Tuominen, R.K., 2016. Protein Kinase C Activation as a Potential Therapeutic Strategy in Alzheimer’s Disease: Is there a Role for Embryonic Lethal Abnormal Vision-like Proteins? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119, 149–160.
<https://doi.org/10.1111/bcpt.12581>
- Thebault, S., Alexander, R.T., Tiel Groenestege, W.M., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., 2009. EGF Increases TRPM6 Activity and Surface Expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 78–85.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2008030327>
- Thiel G, Schmidt T, Rössler OG 2021 Ca²⁺ Microdomains, Calcineurin and the Regulation of Gene Transcription. *Cells.* 10(4):875. doi: 10.3390/cells10040875.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* 21, 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4)
- Topolnik, L., Azzi, M., Morin, F., Kougioumoutzakakis, A., Lacaille, J.-C., 2006. mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons: mGluR1/5 Ca²⁺ signalling and LTP in interneurons. *J. Physiol.* 575, 115–131.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112896>
- Trebak, M., Lemonnier, L., Smyth, J.T., Vazquez, G., Putney, J.W., 2007. Phospholipase C-Coupled Receptors and Activation of TRPC Channels, in: Flockerzi, V., Nilius, B. (Eds.), *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 593–614.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_35
- Tse, D., Takeuchi, T., Kakeyama, M., Kajii, Y., Okuno, H., Tohyama, C., Bito, H., Morris, R.G.M., 2011. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333, 891–895.
<https://doi.org/10.1126/science.1205274>
- Tsien, J.Z., 2000. Building a brainier mouse. *Sci. Am.* 282, 62–68.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0400-62>

- Venero, C., Herrero, A.I., Touyarot, K., Cambon, K., López-Fernández, M.A., Berezin, V., Bock, E., Sandi, C., 2006. Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1585–1595. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04663.x>
- Vennekens, R., Menigoz, A., Nilius, B., 2012. TRPs in the Brain. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 163, 27–64. https://doi.org/10.1007/112_2012_8
- Vennekens, R., Vriens, J., Nilius, B., 2008. Herbal Compounds and Toxins Modulating TRP Channels. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 79–96. <https://doi.org/10.2174/157015908783769644>
- Vukajevic, V., Mastrandese, P., Arnold, A., Peter, F., Kalossa I-T., Wilker, S., Elbest, T., de Quervain, D., Papassotiropoulos, A., Stetak, A. 2020. Evolutionary conserved role of neural cell adhesion molecule-1 in memory. *Trans. Psychiatry* 10(1), 217
- Walmod, P.S., Kolkova, K., Berezin, V., Bock, E., 2004. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem. Res.* 29, 2015–2035. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-6875-z>
- Wang, G.X., Poo, M.-M., 2005. Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434, 898–904. <https://doi.org/10.1038/nature03478>
- Weledji, E.P., 2018. The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM): From Memory Formation to Cancer. *Arch. Clin. Pathol.* 1.
- Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., Montell, C., 1995. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9652–9656. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9652>
- Wierońska, J.M., Cieślik P., 2017. Glutaminian i jego receptory, czyli o tym, jak można uleczyć mózg. *Wszechświat* 118, 178–187.
- Wu, L.-J., Sweet, T.-B., Clapham, D.E., 2010a. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol. Rev.* 62, 381–404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>
- Wu, L.-J., Sweet, T.-B., Clapham, D.E., 2010b. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol. Rev.* 62, 381–404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>
- Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P.S., Curtis, R., Clapham, D.E., 2002. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature00882>
- Yamada, K., Mizuno, M., Nabeshima, T., 2002. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 70, 735–744. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01461-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01461-8)

- Yamamoto, S., Wajima, T., Hara, Y., Nishida, M., Mori, Y., 2007. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1772, 958–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.03.006>
- Zechel, S., Werner, S., von Bohlen und Halbach, O., 2007. Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res.* 328, 651–656. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0388-4>
- Zeng, Y., Wagner, E.J., Cullen, B.R., 2002. Both Natural and Designed Micro RNAs Can Inhibit the Expression of Cognate mRNAs When Expressed in Human Cells. *Mol. Cell* 9, 1327–1333. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00541-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00541-5)
- Zhang, E., Liao, P., 2015. Brain transient receptor potential channels and stroke: Brain TRP Channels and Stroke. *J. Neurosci. Res.* 93, 1165–1183. <https://doi.org/10.1002/jnr.23529>
- Zhu, X., Chu, P.B., Peyton, M., Birnbaumer, L., 1995. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene. *FEBS Lett.* 373, 193–198.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Fischer, M.M.J., Messlinger, K., Nau, C., Reeh, P.W., 2005. The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxydiphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wildtype but not TRPV1 deficient mice. *Neuroscience* 135, 1277–1284. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.018>