

Rozprawa habilitacyjna
Pracownia Farmakoneurochemii
Zakład Neurochemii
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

Autor:

Dr Elżbieta Salińska

Tytuł pracy:

Udział receptorów dla aminokwasów pobudzających w konsolidacji i rekonsolidacji pamięci: badania z użyciem modelu biernego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt

Rozprawa obejmuje cykl publikacji:

1. Salińska E., Chaudhury D., Bourne R.C., Rose S.P.R.: Passive avoidance training results in increased responsiveness of voltage- and ligand-gated calcium channels in chick brain synaptoneuroosomes, *Neuroscience*, 1999, 93(4), 1507-1514.
2. Salińska E., Bourne R.C., Rose S.P.R.: Long-term memory formation in the chick requires mobilisation of ryanodine-sensitive intracellular calcium stores. *Neurobiol. Learn Memory*, 2001, 75(3), 293-302.
3. Salińska E., Stafiej A.: Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release, *Neurochem. Int.*, 2003, 43(4-5), 469-474.
4. Salinska E, Bourne RC, Rose SP.: 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*. 2004, 19(11):3042-7.

Komentarz

Uczenie się i zapamiętywanie są procesami związanymi z życiem każdego zwierzęcia, również człowieka. Mimo powszechności tych procesów, ich mechanizm oraz biochemiczne podstawy nie zostały jeszcze poznane w wystarczający sposób. Mózg, jako główny ośrodek w którym te procesy zachodzą, jest od wielu lat obiektem intensywnych badań. W ciągu tych lat 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. Badania wykazały, że doświadczenia nabywane w czasie nauki wywołują krótkotrwałe zmiany w przewodności synaptycznej w specyficznych rejonach mózgu zwierząt. Te impulsy zapoczątkowują kaskadę wewnątrzkomórkowych przemian, które prowadzą do trwałych zmian w połączeniach synaptycznych, co związane jest z konsolidacją pamięci. Procesy te, uporządkowane pod względem sekwencji czasowej, zapoczątkowane są bezpośrednio po przeprowadzeniu treningu, a kolejne etapy włączają się minuty, godziny a być może i dni po zainicjowaniu.

W związku z czasowym rozciągnięciem procesów związanych z formowaniem pamięci, od lat funkcjonują pojęcia pamięci krótkotrwałej (ang. short term memory) oraz pamięci długotrwałej (ang. long term memory). Uważa się, że pamięć krótkotrwała tworzona jest w ciągu krótkiego czasu od treningu i bazuje na przejściowych modyfikacjach wcześniej istniejących białek, głównie na fosforylacji i defosforylacji enzymów, receptorów lub kanałów jonowych, mogących momentalnie zmieniać wydajność przewodności synaptycznej (Mons et al. 1999; Micheau i Riedel 1999; Riedel 1999). Pamięć ta może funkcjonować od minut do godzin. Pamięć długotrwała natomiast wydaje się być zależna od syntezy nowych białek (Davis i Squire, 1984) i związana jest ze zmianami strukturalnymi istniejących już połączeń synaptycznych oraz z generacją nowych (Bailey i Kandel, 1993; Moser i wsp. 1994). Funkcjonuje ona godziny, dni, tygodnie i lata po seansie uczenia (Stork i Welzl).

Jednym z pierwszych etapów komórkowych reakcji związanych z procesami nauki i zapamiętywania jest aktywacja komórek nerwowych i uwalnianie neurotransmiterów. Mamy tutaj do czynienia z aktywacją nie jednego, ale wielu systemów przewodności nerwowej, takich jak cholinergiczny, glutamatergiczny, noradrenergiczny, serotonergiczny i inne (Woolf, 1998). Jednakże większość badaczy jest zgodna, że głównym elementem zapoczątkowującym procesy tworzenia się pamięci jest aktywacja systemu glutamatergicznego. Aminokwasowe neurotransmitery pobudzające uwalniane z zakończeń

presynaptycznych aktywują postsynaptyczne receptory i otwierają sprzężone z nimi kanały jonowe (kanały sprzężone z receptorami NMDA i AMPA) powodując napływ do neuronów jonów, w tym Ca^{2+} . Aktywowane są także napięciowo-zależne kanały jonowe. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) uruchamia kaskadę pre- oraz postsynaptycznych reakcji, które w końcowym efekcie prowadzą do zmian w połączeniach nerwowych. Do takich reakcji należą między innymi aktywacja przekaźników drugiego stopnia, czynników transkrypcyjnych oraz genów wczesnej odpowiedzi, a także późniejszy wzrost syntezy białek strukturalnych takich jak NCAM oraz L1, które wbudowywane są w błony synaptyczne i modyfikują ich strukturę. W tym samym czasie zachodzą również procesy interakcyjne pomiędzy pre- i postsynaptycznymi błonami, w których pośredniczą przekaźniki drugiego stopnia uwalniane do przestrzeni synaptycznych, takie jak tlenek azotu (NO) oraz kwas arachidonowy (AA).

Jak omówiono powyżej, aktywacja receptorów glutamatergicznych, zarówno jonotropowych jak i metabotropowych, jest ważnym etapem w inicjowaniu procesów formowania pamięci i plastyczności komórek nerwowych (Kaczmarek i wsp., 1997). Celem badań objętych przedstawioną rozprawą było poszerzenie wiedzy o wewnątrzkomórkowych sygnałach inicjowanych przez pobudzenie tych receptorów w mózgu zwierzęcia doświadczalnego poddanego treningowi oraz zbadanie ich udziału w formowaniu i konsolidacji pamięci. Szczególną uwagę zwrócono na czas, w jakim te receptory włączają się w kaskadę wewnątrzkomórkowych przemian, a co za tym idzie określenie, w której fazie procesu formowania pamięci biorą one udział. Ponadto celem badań było określenie udziału wewnątrzkomórkowych magazynów Ca^{2+} w tym procesie. Podjęto również próbę wyjaśnienia niektórych procesów zachodzących po reaktywowaniu elementów pamięci, uznanej za w pełni skonsolidowaną.

Model badawczy

Model pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt (one-trial passive avoidance learning task) został opracowany przez Cherkin'a (1969) i opiera się na skłonności młodych kurcząt do dziobania małych obiektów, takich jak np. ziarna. Kurczęta dziobią metalowe ziarenko zwilżone substancją o bardzo gorzkim smaku (metyl-antranilat – MeA) i unikają ponownego dziobania tego obiektu. Pamięć o gorzkim smaku utrzymuje się ponad 48 godzin. Zaletą tej metody jest krótki i ściśle określony czas treningu (kurczęta dziobią podsunięte ziarenko w ciągu 10 sekund), a każdy kurczak jest

trenowany i testowany tylko raz. Jednodniowe kurczęta mają stosunkowo duże, dobrze rozwinięte mózgi oraz miękka, nie skostniała jeszcze czaszkę, co sprawia, że domózgowe iniekcje są łatwe i nie wymagają dodatkowego znieczulenia, a brak bariery krew-mózg u tych młodych zwierząt sprawia, że środki podane systemowo szybko docierają do mózgu (Rose, 2000).

W tym modelu doświadczalnym można obserwować zarówno efekty behawioralne podanych środków farmakologicznych, wskazujące na ich wpływ na pamięć zwierzęcia, jak i przeprowadzać bardziej wnikliwe badania biochemiczne, immunocytochemiczne, radiograficzne czy analizę mikroskopową wybranych okolic mózgu. Na podstawie wcześniejszych badań stwierdzono, że dwa rejony mózgu kurczęcia zaangażowane są szczególnie w procesach zapamiętywania, są to *intermediate medial hyperstriatum ventrale* (nazwa stosowana w literaturze) (IMHV), kojarzony z częścią „podkorową” mózgu kurczęcia, oraz lobus parolfactorius (LPO), homolog jądra podstawnego (Kossut i Rose, 1984; Csillag, 1999). Stwierdzono również, że większość procesów związanych z uczeniem i wczesnym zapamiętywaniem u kurczęcia wiąże się z IMHV zlokalizowanym w lewej półkuli, a dopiero po pewnym czasie włączana jest półkula prawa (Rose, 1991; Rogers i Deng, 1999). LPO uważany jest za ośrodek odpowiedzialny za pamięć długotrwałą oraz prawdopodobnie bierze udział w procesach rekonsolidacji pamięci.

Udział sygnału wapniowego w formowaniu pamięci

Aktywacja napięciowo-zależnych kanałów wapniowych (ang. voltage operated calcium channels – VOCCs) oraz kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami NMDA i częściowo AMPA prowadzi do ich otwarcia i napływu Ca^{2+} do neuronów (Rizzuto, 2002; Schneggenburg i wsp., 1993). Napływ Ca^{2+} do komórek nerwowych uruchamia ciąg wewnątrzkomórkowych reakcji prowadzących do aktywacji enzymów, takich jak kinaza białkowa C, fosfolipaza A2, fosfolipaza C oraz zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny kinaza białkowa II (Zhao i wsp., 1996; Reymann, 1991; Alkon i wsp., 1998). Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ prowadząc do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego CREB i zmiany ekspresji genów może wpływać na produkcję nowych białek, a tym samym na procesy związane z plastycznością i zapamiętywaniem.

Wiadomo, że ω -konotoksyna GVIA, inhibitor VOCCs typu N, powoduje amnezję w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u kurcząt (Clements i wsp., 1995). Zaobserwowane działanie ω -konotoksyny hamujące uwalnianie neuroprzekazników sugeruje, że VOCCs typu N i sygnał wapniowy generowany przez ich pobudzenie, są

bezpośrednio zaangażowane w kontrolowane przez napływ Ca^{2+} uwalnianie neuroprzekazników (Zengel i wsp., 1993).

Wczesne (w przeciągu minut po treningu) zahamowanie aktywacji receptorów NMDA przez antagonistów takich jak MK-801 czy AP5, powoduje zaburzenia zapamiętywania w modelu pamięci przestrzennej, dyskryminacji zapachowej oraz unikaniu negatywnych bodźców smakowych (Burchuladze i wsp., 1992; Davis i wsp., 1992; Heale i wsp., 1990; Stabuli i wsp., 1989). Wykazano także, że związki będące antagonistami receptorów AMPA, takie jak CNQX czy DNQX, podane w różnych czasach po treningu, powodują zaburzenia pamięci w różnych modelach doświadczalnych (Flood i wsp., 1990; Jerusalinsky i wsp., 1992; Steel i wsp., 1995).

Dodatkową reakcją, uruchamianą przez napływ Ca^{2+} do wnętrza neuronów i potęgującą sygnał wapniowy, jest uwalnianie Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych w retikulum endoplazmatycznym (ER). Wapń uwalniany jest z tych magazynów na skutek aktywacji znajdujących się na błonie endoplazmatycznej receptorów wrażliwych na trójfosforan inozytoli (IP_3R) oraz wrażliwych na Ca^{2+} tzw. receptorów rianodynowych (RyR). Proces ten znany jest jako „zależne od wapnia uwalnianie wapnia wewnątrzkomórkowego” (ang. calcium induced calcium release – CICR) (Verkhatsky, 2002). Wniknięcie Ca^{2+} do neuronu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej uruchamia sygnał o niewielkiej amplitudzie i o lokalnym charakterze w porównaniu do rozległego i dłużej utrzymującego się sygnału spotęgowanego przez CICR (Alkon, 1998).

Omawiana praca: Salinska E, Chaudhury D, Bourne RC, Rose SPR (1999) Passive avoidance training results in increased responsiveness of voltage- and ligand-gated calcium channels in chick brain synaptoneurosomes. Neuroscience 93(4): 1507-1514

W przeciągu minut po treningu obserwuje się podwyższone uwalnianie glutaminianu oraz wiązanie agonistów receptorów NMDA w obrębie IMHV. Natomiast w czasie 5-6 godzin po treningu obserwowano podwyższone wiązanie agonistów receptorów AMPA w tym samym rejonie mózgu kurczęcia. Procesy te wskazują na aktywację receptorów i możliwość napływu w tym czasie jonów wapnia do wnętrza neuronów. W celu potwierdzenia tego przypuszczenia przeprowadzono pomiary zmian wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w synaptoneurosomach izolowanych z rejonu IMHV. Tkanę izolowano w różnych odstępach czasu po treningu. Otrzymane synaptoneurosomy stymulowano w obecności Ca^{2+} odpowiednio wysokim stężeniem KCl lub NMDA i AMPA, a zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mierzone były przy użyciu markera wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia – Fura 2-AM.

W synaptoneurosomach izolowanych natychmiast oraz 5 min po treningu obserwowano zwiększony napływ Ca^{2+} po stymulacji VOCCs wysokimi stężeniami potasu. Efektu tego nie obserwowano w późniejszym czasie. Stymulacja receptorów NMDA powodowała podwyższony napływ Ca^{2+} do synaptoneurosomów w czasie 10-30 min po treningu, a stymulacja receptorów AMPA w czasie pomiędzy 3 godz. a 6 godz.

Wyniki wskazują, że bezpośrednio po treningu następuje włączenie VOCCs, prawdopodobnie zarówno pre- jak i post-synaptycznych, w procesy zainicjowania kaskady reakcji związanych z formowaniem pamięci. W krótkim czasie, w odpowiedzi na uwalnianie glutaminian, do kaskady włączone zostają receptory NMDA i wewnątrzkomórkowy sygnał wapniowy zainicjowany otwarciem kanałów z nimi sprzężonych. Mechanizmy związane z aktywacją receptorów AMPA i napływem wapnia przez kanały z nimi związane, włączają się na późniejszych etapach formowania pamięci. Podwyższona odpowiedź badanych kanałów wapniowych na stymulację agonistami oraz generowany sygnał wapniowy pozostaje w zgodzie z proponowaną sekwencją wydarzeń wewnątrzkomórkowych zachodzących w tworzeniu pamięci w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u kurcząt.

Omawiana praca: **Salinska E, Bourne RC, Rose SPR (2001) Long-term memory formation in the chick requires mobilization of ryanodine-sensitive intracellular calcium stores. Neurobiol. Learn Mem. 75: 293-302**

Opisany we wcześniejszej pracy, zależny od przeprowadzonego treningu, a wywołany stymulacją receptorów NMDA oraz AMPA, wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu kurcząt, może mieć dwa źródła: może być wynikiem napływu Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej poprzez VOCCs lub sprzężone z receptorami glutaminianu kanały wapniowe, lub też efektem połączenia tego napływu z mobilizacją Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych. Mechanizm określany CICR, angażujący aktywację receptorów rianodynowych oraz jego potencjalny udział w procesach związanych z nauką i formowaniem pamięci, wzbudził nasze zainteresowanie. Obecność tych receptorów w mózgu kurczęcia potwierdzona została przez wielu badaczy (Ivanienko i wsp., 1993; Ouyang i wsp., 1997), wiadomo również, że zablokowanie uwalniania Ca^{2+} z magazynów wrażliwych na rianodynę powoduje zaburzenia w tworzeniu pamięci (Ohnuki i wsp., 1996). Postanowiono sprawdzić, czy uwalnianie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} jest niezbędne zarówno w procesach inicjujących formowanie pamięci, jak i na późniejszych etapach biochemicznej kaskady.

W badaniach zastosowano dantrolen, związek będący inhibitorem uwalniania Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów znajdujących się w obrębie ER i wrażliwych na rianodynę. Efekt dantrolenu badano zarówno w bezpośrednim działaniu na zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w zakończeniach nerwowych, jak i jego działanie na zapamiętywanie treningu przez kurczęta (efekt behawioralny). Iniekcja domózgowa dantrolenu, dokonana w czasie pomiędzy 30 minutą przed i 30 minutą po treningu, powodowała amnezję, objawiającą się u kurcząt testowanych 3 godziny i więcej po treningu. Iniekcja dantrolenu w innym czasie nie powodowała amnezji. Preinkubacja w obecności dantrolenu synaptoneurosomów izolowanych 10 min po treningu znosiła obserwowany wcześniej, wywołany stymulacją receptorów NMDA, wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Natomiast obserwowany wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po stymulacji AMPA w synaptoneurosomach izolowanych 6 godzin po treningu nie zmienił się po zadziałaniu dantrolenu. Sugeruje to, że silny sygnał wapniowy wzmocniony przez Ca^{2+} uwolniony z wewnątrzkomórkowych magazynów niezbędny jest we wstępnej fazie tworzenia pamięci. Wyniki wskazują również na zaangażowanie na tym wczesnym etapie magazynów Ca^{2+} wrażliwych na rianodynę i na ich ważną rolę w badanym procesie.

Udział metabotropowych receptorów glutaminianu we wczesnych etapach tworzenia pamięci

Metabotropowe receptory glutaminianu (mGluRs) tworzą zbór receptorów podzielonych na trzy grupy w skład których wchodzi osiem heterometrów. Połączone są one z różnymi systemami wewnątrzkomórkowych przekaźników modulujących przekaźnictwo synaptyczne (De Blasi i wsp., 2001). mGluRs grupy I (mGluR1 i mGluR5) sprzężone są z fosfolipazą C i odpowiedzialne są za wzrost stężenia trójfosforan inozytolu (IP_3) i diacyloglicerolu, które biorą udział w uwalnianiu Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów oraz aktywacji kinazy białkowej C (Nakanishi, 1994). Receptory grupy II (mGluR2 i mGluR3) oraz grupy III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) negatywnie modulują działanie cyklazy adenylowej.

Uważa się, że mGluRs odgrywają ważną rolę zarówno w procesach związanych z długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (ang. long term potentiation - LTP), głównym modelem plastyczności synaptycznej, jak i w procesach związanych z nauką i zapamiętywaniem. Panuje jednak opinia, że nie biorą one udziału, lub że udział ten jest znikomy, w tworzeniu pamięci krótkotrwałej, jednak pełnią kluczową rolę w procesach tworzenia pamięci długotrwałej i jej konsolidacji (Riedel i wsp., 2003).

Większość danych wskazuje, że aktywacja mGluRs grupy II i III po treningu podwyższa konsolidację pamięci, natomiast zablokowanie lub nadmierna aktywacja mGluRs grupy I zaburza konsolidację i tworzenie pamięci. W badaniach, w których stosowano związki będące specyficznymi antagonistami mGluRs grupy I i II wykazano, że nie tylko biorą one udział w zapamiętywaniu punktów orientacyjnych oraz tworzeniu pamięci roboczej (tzw. „working memory”), ale także odgrywają różne role w LTP i długotrwałym osłabieniu synaptycznym (ang. long term depression - LTD) (Balschun i wsp., 1998; Manahan-Vaughan 1997; Ohno i wsp., 1998). Antagoniści mGluRs wywołują również amnezję w modelu unikania negatywnych bodźców smakowych u kurcząt, jeśli podano je w krótkim czasie przed lub po treningu (Rickard i wsp., 1995; Holscher, 1994).

Wyniki doświadczeń przeprowadzanych z agonistami mGluRs grupy I i II dostarczyły niejednoznacznych informacji. Zastosowanie agonisty o nazwie ACPD spowodowało wzmocnienie pamięci węchowej (Kaba i wsp., 1994) i w modelu pasywnego unikania (Bianchin i wsp., 1994), wywołało jednak osłabienie procesu uczenia w labiryncie wodnym Morrisa (ang. Morris water maze) z widoczną platformą i bez platformy (Pettit i wsp., 1994; Packard i wsp., 2001). Wyniki tych badań wskazują na złożoną rolę mGluRs w procesach związanych z uczeniem i zapamiętywaniem i zależność efektu ich modulacji od rodzaju badanej pamięci, rodzaju użytych agonistów lub antagonistów, dawki oraz czasu zadziałania.

Omawiana praca: Salińska E., Stafiej O. (2003) Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. *Neurochem. Int.* 43: 469-474

Aktywacja mGluRs wpływa na uwalnianie neuroprzekazników oraz na uruchamianie wewnątrzkomórkowych przekazników drugiego stopnia. Modulacja działania mGluRs przy użyciu agonistów lub antagonistów wpływa na procesy zależne od ich aktywacji, w tym na procesy związane z nauką i zapamiętywaniem. Niejednoznaczne wyniki doświadczeń z ACPD, agonistą mGluRs o powinowactwie do I i II grupy w badaniach na modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców u kurcząt wskazały na potrzebę użycia bardziej selektywnych agonistów. W pracy tej posłużono się związkiem ABHxD-I, zsyntetyzowanym przez Kozikowskiego i wsp. (1998) będącym ok. 30 razy silniejszym agonistą receptorów mGluRs grupy I i II niż ACPD, jednak ze znacznie większym powinowactwem do receptorów grupy II. Celem badań było porównanie działania obu agonistów na zapamiętywanie u kurcząt oraz ich wpływu na uwalnianie glutaminianu w mózgu kurcząt kontrolnych i poddanych treningowi. Badano działanie obu agonistów na poziomie behawioralnym, jak i na uwalnianie

glutaminianu ze skrawków mózgu kurcząt trenowanych i kontrolnych po stymulacji wysokimi stężeniami jonów potasu. Poziom glutaminianu mierzono przy użyciu HPLC. Wykazano, że oba związki wywołują amnezję u kurcząt, jeśli podane zostały na 30 min przed treningiem, jednakże procent kurcząt z amnezją, w wypadku zastosowania ABHxD-I, jest dwukrotnie większy. Podanie agonistów w czasie 30 min i więcej po treningu nie powodowało amnezji. Uwalnianie glutaminianu u zwierząt kontrolnych, którym podano ACPD lub ABHxD-I było podwyższone w stosunku do kontroli, co może wskazywać na większy udział mGluRs grupy I w obserwowanym efekcie. Trening również powodował zwiększone uwalnianie glutaminianu, jednakże ani ACPD ani ABHxD-I nie zmieniały uwalniania glutaminianu u zwierząt poddanych treningowi. Opierając się na tych wynikach można stwierdzić, że mGluRs grup I i II biorą udział we wczesnych etapach tworzenia pamięci. Podanie agonistów tych receptorów przed treningiem powoduje aktywację receptorów do poziomu, w którym pobudzenie wywołane treningiem traci na znaczeniu i ginie w ogólnym „szumie” informacyjnym (Riedel i wsp., 1996).

Konsolidacja a rekonsolidacja pamięci

Nowe umiejętności nabyte drogą nauki (treningu) są przekształcane w pamięć długotrwałą w wyniku kolejno następujących po sobie reakcji wewnątrz neuronów i w końcowym efekcie modulacji połączeń synaptycznych. Proces ten nazywany został konsolidacją pamięci.

Aktywacja jonotropowych receptorów glutamatergicznych, podobnie jak VOCCs, prowadzi do wzrostu $[Ca^{2+}]_i$, aktywacji szeregu enzymów, takich jak kinaza białkowa II zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaMK II), fosfolipaza A2, kinaza białkowa C i kinaza białkowa A. Dalszym efektem napływu Ca^{2+} do neuronów jest uruchomienie syntezy białek. Sygnał wapniowy oraz podwyższony poziom cAMP aktywują fosforylację jądrowego czynnika transkrypcyjnego CREB, co uruchamia ekspresję wczesnych genów i produkcję białek typu Fos, Jun i Knox (zwanego też Egr) (Platenik et al., 2000). Białka te dimeryzują tworząc białko aktywujące (AP1), niezbędne do dalszej syntezy białek docelowych, takich jak białka strukturalne oraz inne białka biorące udział w modyfikacji zakończeń nerwowych. Zgromadzono wiele danych doświadczalnych, pokazujących zwiększoną aktywność c-Fos podczas zapamiętywania, oraz że zakłóceniom działania tego białka zawsze towarzyszyły zaburzenia zapamiętywania.

Synteza białek jest uważana za ważny etap w konsolidacji pamięci i jak wykazano, u kurcząt zachodzi w dwóch przedziałach czasowych. Pierwszy z nich zapoczątkowany jest

bezpośrednio po treningu i trwa do 2 godzin. Druga fala syntezy białek obserwowana jest w 4 do 6 godzin po treningu. Inhibitory białek wywołują trwałą amnezję, jeśli podane są tuż przed lub po treningu, a także w 4-6 godzin później (Freeman i wsp., 1995; Anokhin i wsp., 2002).

W procesach zapamiętywania ważną rolę odgrywa również modyfikacja już istniejących białek w błonach synaptycznych. Zahamowanie glikozylacji białek, zwłaszcza tzw. cząsteczek adhezyjnych (ang. cell-adhesion molecules) powoduje amnezję (Matthies, 1989; Freeman i wsp., 1995; Crowe i wsp., 1994). Efekt taki w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u kurcząt obserwuje się, gdy inhibitor glikozylacji podany zostanie w czasie sąsiadującym z treningiem lub 6-8 godzin później (Tiunova i wsp., 1998). Te dwa czasy działania inhibitorów glikozylacji skorelowane są z syntezą białek zachodzącą po treningu. Wcześniejszy czas działania inhibitorów glikozylacji w pierwszej fazie sugeruje, że modyfikacji ulegają już istniejące białka strukturalne, natomiast w drugiej fazie ma prawdopodobnie miejsce glikozylacja nowo zsyntetyzowanych białek (Rose, 2000)

Komórkowa teoria konsolidacji została zakwestionowana przez wczesne badania, w których wykazano, że można wywołać amnezję, jeśli w pełni skonsolidowana i trwała pamięć została reaktywowana i zadziałały czynniki amnezyjne (Misanin i wsp., 1968). Uważana za kompletnie skonsolidowaną pamięć, poddana reaktywacji ponownie staje się wrażliwa na czynniki amnezyjne, lecz tylko, jeśli zadziałają one w określonym czasie (Przybylski i wsp., 1999; Anokhin i wsp., 2002). Fenomen ten został opisany w badaniach przeprowadzanych na różnych gatunkach zwierząt, z użyciem różnych procedur treningu oraz różnych czynników amnezyjnych (Sara, 2000). Dane te wskazują, że stare wspomnienia, przypomniane na nowo, przechodzą ponowny proces konsolidacji, nazywany rekonsolidacją pamięci. Nie jest jednak pewne, czy oba te procesy przebiegają w taki sam sposób. Wiele danych wskazuje, że przynajmniej część procesów wewnątrzkomórkowych, które biorą udział w konsolidacji pamięci, zachodzi za każdym razem, gdy pamięć jest reaktywowana. Jednakże procesy konsolidacji i rekonsolidacji pamięci wykazują również znaczące różnice.

Omawiana praca: **Salinska E, Bourne RC, Rose SP. (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(11):3042-7.**

Postanowiono zbadać, czy reaktywacja pamięci powoduje uruchomienie tych samych procesów, co trening pierwotny. W pracy tej szczególną uwagę zwrócono na syntezę oraz glikozylację białek, czy zachodzi ona w taki sam sposób jak w konsolidacji pamięci i czy zaangażowane są te same rejony mózgu kurczęcia. Przypomnienie treningu przeprowadzono

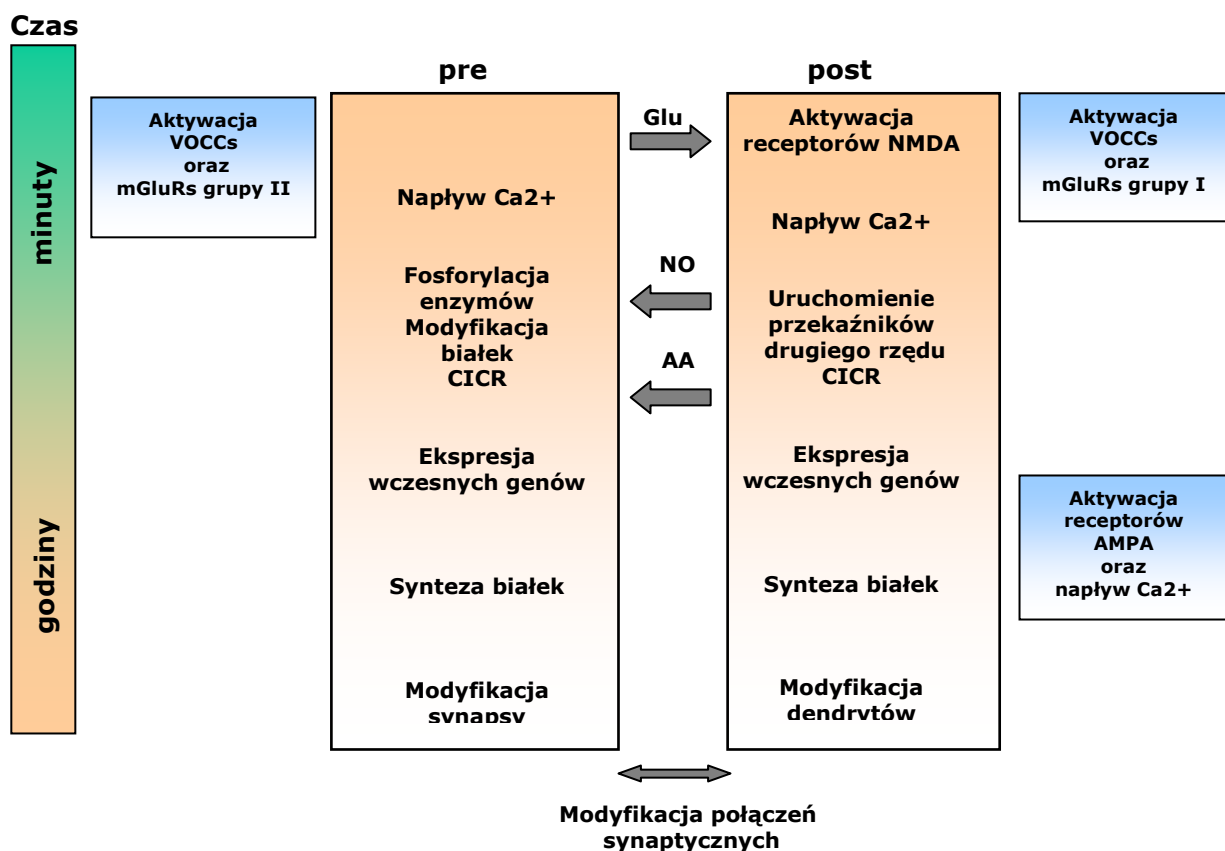
w czasie uważanym za wystarczający do pełnego skonsolidowania pamięci tzn. 24 godziny po treningu pierwotnym oraz 2 godziny po treningu w czasie, w którym pamięć długoterminowa nie została jeszcze skonsolidowana. Badano efekt podania inhibitorów syntezy białek oraz glikozylacji, wbudowywanie do białek znakowanej 2-dezoksy-glukozy oraz ekspresję białka c-Fos. Wykazano, że działanie amnezyjne zarówno inhibitora syntezy białek, jak i glikozylacji, było przejściowe i zależne od czasu, w którym przeprowadzono przypomnienie treningu, a także od czasu, w którym inhibitory były podane. Stwierdzono znaczne różnice w stosunku do treningu początkowego. Badane wbudowywanie znakowanej 2-dezoksy-glukozy wzrosło podobnie jak po treningu początkowym, lecz obserwowane było nie tylko w IMHV, ale też i LPO, w którym było znacznie wyższe. Wzrost ekspresji białka c-Fos po przypomnieniu treningu obserwowany był tylko w LPO, rejonie mózgu kurczęcia wiązonym z późną fazą przetwarzania pamięci oraz z przypominaniem. Wyniki wskazują, że w badanym modelu przypomnienie treningu aktywuje biochemiczną kaskadę, analogiczną do obserwowanej w konsolidacji pamięci, ale różniącą się pod względem czasowym i lokalizacji w strukturach mózgowych. Dlatego można stwierdzić, że zarówno pod względem molekularnym jak i komórkowym rekonsolidacja nie odzwierciedla całkowicie konsolidacji pamięci. Jedną z takich różnic jest efekt działania czynników amnezyjnych. Zarówno inhibitory syntezy białka jak i glikozylacji podane po początkowym treningu, w okresie konsolidacji pamięci, powodują całkowitą utratę pamięci o nabytych umiejętnościach, natomiast w przypadku rekonsolidacji, amnezja jest przejściowa. Sugeruje się, że w przypadku działania czynników amnezyjnych w procesach rekonsolidacji amnezja spowodowana jest zahamowaniem zdolności do przywołania informacji, a nie jej wymazaniem.

Podsumowanie

Procesy związane z uczeniem i zapamiętywaniem są obiektem badań od ponad wieku. Na podstawie wyników badań wielu naukowców stwierdzono, że zapamiętanie nowych informacji lub umiejętności związane jest z szeregiem procesów, jakie muszą zajść w mózgu, zanim pamięć zostanie w pełni uformowana, czyli inaczej mówiąc skonsolidowana. Odkryto również, że procesy te nie zachodzą w jednym rejonie mózgu, ale że różne jego struktury są angażowane w zależności od czasu, jaki upłynął od treningu. Ponieważ do badań nad procesami zapamiętywania stosowane są różne modele doświadczalne, wykorzystujące zwierzęta znajdujące się na różnym poziomie ewolucji i różnej budowie ośrodkowego układu

nerwowego, rejony mózgu zaangażowane w te procesy różnią się w zależności od gatunku. Jednakże na poziomie komórkowym różnice te niwelują się. Kaskada wewnątrzkomórkowych procesów zachodzących po treningu w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u kurcząt, odpowiada podobnym procesom obserwowanym w innych modelach i u innych zwierząt (Izquierdo i wsp., 1997; Riedel i wsp., 2003).

Opierając się na wynikach dotychczasowych badań, Rose i wsp. (1999) stworzyli model kaskady reakcji zachodzących w neuronach mózgu kurczęcia poddanego treningowi. W świetle przedstawionych tutaj wyników do schematu tego można dodać kilka dodatkowych elementów (Rys 1).



Rys 1. Uproszczony schemat reakcji zachodzących podczas formowania pamięci w obszarach pre- i post-synaptycznych. Z boku zaznaczone elementy badane w omawianych pracach.

Wczesna aktywacja VOCCs oraz receptorów NMDA jest elementem związanym z zapoczątkowaniem wewnątrzkomórkowych reakcji prowadzących do konsolidacji pamięci. Wykazany w jednej z omawianych prac (Salinska i wsp., 1999) wzrost aktywności VOCCs, a

także kanałów wapniowych związanych z receptorami NMDA może być efektem przedłużonej fosforylacji białek wchodzących w skład tych kanałów. Wiadomo, że fosforylacja tyrozyny w białkach kanałów, za którą odpowiedzialna jest niezwiązana z receptorami kinaza tyrozynowa z grupy Src, powoduje wzrost aktywności tych kanałów i zwiększony napływ Ca^{2+} do neuronów (Purcell i wsp., 2003). Obserwowano zwiększoną aktywność kinazy tyrozynowej Src po treningu u szczurów (Zhao i wsp., 2000), a także wykazano, że jej udział jest niezbędny w procesach zapamiętywania (Bevilaqua i wsp., 2003).

Jak wynika z przedstawionych badań, na wczesnym etapie formowania pamięci neurony otrzymują silny sygnał wapniowy, wzmocniony dodatkowo przez uwolnienie Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych poprzez aktywację receptorów rianodynowych. Aczkolwiek uważa się, że mGluRs, głównie grupy I i II odgrywają ważną rolę w procesach odpowiedzialnych za formowanie pamięci długoterminowej (Riedel i wsp., 2003), to jednak ich udział we wczesnych etapach zapamiętywania jest również nie bez znaczenia. Pobudzenie mGluRs grupy I prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, i w efekcie jej działania do wzrostu stężenia IP_3 oraz diacyloglicerolu. Oba te związki biorą udział w uwalnianiu Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych i aktywacji kinazy białkowej C, a więc w reakcjach prowadzących do formowania pamięci późnej. Wykazano jednak, że manipulacja aktywnością mGluRs grupy I może prowadzić też do modulowania pamięci krótkotrwałej (Christoffersen i wsp., 1999). Ponadto w wielu badaniach wykazano, że aktywacja mGluRs grupy I powoduje wzrost uwalniania glutaminianu (Cartmell i wsp., 2000).

mGluRs grupy II również biorą udział w regulacji uwalniania glutaminianu z zakończeń presynaptycznych. W warunkach podwyższonego uwalniania glutaminianu, będącego jednym z elementów przekąźnictwa synaptycznego, aktywowane są też położone presynaptycznie mGluRs grupy II, a ich pobudzenie prowadzi do zahamowania uwalniania glutaminianu i powrotu jego poziomu do „normalnego” (Cartmell i wsp., 2000). Aktywacja mGluRs grupy II powoduje również spadek aktywności fosfokinazy A (PKA) oraz wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, czynnika stymulującego, między innymi, transkrypcję. Wykazano, że zaburzenia we wczesnych fazach formowania pamięci, transmisja sygnału na drodze cAMP/PKA, zachodząca za pośrednictwem mGluRs grupy II, wpływa negatywnie na ten proces i że zarówno nadmierna aktywacja, jak i inhibicja tych receptorów może spowodować osłabienie pamięci (Sato i wsp., 2004).

Molekularne efekty aktywacji zarówno mGluRs grupy I jak i grupy II są niezbędne w kaskadzie przemian towarzyszącej konsolidacji pamięci. Wykazano, że aktywacja mGluRs grupy II i III w określonym czasie po treningu może wzmacniać proces konsolidacji pamięci,

podobnie jak zahamowanie (ale też i aktywacja) w tym samym czasie mGluRs grupy I (Riedel i wsp., 2003). Jednakże zahamowanie lub nadmierna aktywacja tych receptorów na krótko przed lub tuż po treningu prowadzi do amnezji. Nasze wyniki badań wskazują, że wczesne etapy formowania pamięci u kurcząt, podobnie jak i u innych zwierząt, są bardzo wrażliwe na manipulowanie aktywnością receptorów metabotropowych. Nadmierne uwalnianie glutaminianu spowodowane aktywacją mGluRs grupy I zaburza jeden z pierwszych sygnałów uruchamiających kaskadę molekularnych reakcji, pociągając za sobą rozregulowanie wewnątrzkomórkowego przekazywania zależnego zarówno od receptorów jonotropowych jak i mGluRs grupy I i grupy II

Przez dłuższy czas uważano, że receptory AMPA nie biorą udziału w procesach związanych z zapamiętywaniem u kurczaka (Burchuladze i wsp., 1992), a Izquierdo i Medina jeszcze w 1997 wskazują na brak udziału receptorów AMPA jako główną różnicę pomiędzy procesami formowania pamięci u kurcząt i szczurów. Jednakże późniejsze badania wykazały, że receptory AMPA są zaangażowane w tworzeniu pamięci u kurcząt w czasie późniejszym, gdy pamięć krótkotrwała przechodzi w długotrwałą i zaczyna się jej konsolidacja (Rickard i wsp., 1994; Steele i wsp., 1995). Aktywacja receptorów AMPA powoduje depolaryzację i uruchomienie VOCCs, co z kolei prowadzi do napływu Ca^{2+} do neuronów. Jednakże część receptorów AMPA jest związana z kanałami przepuszczalnymi dla Ca^{2+} i umożliwia bezpośredni ich napływ do komórki. Obserwowana podwyższona aktywność receptorów AMPA spowodowana jest najpewniej zwiększeniem liczby tych receptorów w błonach synaptycznych. Wykazano, że pobudzenie typu LTP oraz trening powodują egzocytozę i wbudowywanie receptorów AMPA do błon (Carroll i wsp., 2001). W mózgu kurczęcia stwierdzono zwiększone wiązanie [3H]AMPA w rejonie IMHV, które miało miejsce w 6.5 godziny po treningu (Steele i wsp., 1995).

Na podstawie przedstawionych wyników możemy stwierdzić, że sygnał wapniowy generowany aktywacją receptorów AMPA, może odgrywać ważną rolę na późniejszym etapie formowania pamięci. Sygnał ten nie jest silny, gdyż nie jest on wzmocniony przez Ca^{2+} uwolnione z magazynów wewnątrzkomórkowych, ale prawdopodobnie jest wystarczający do aktywacji enzymów biorących udział w modyfikacji białek syntetyzowanych we wcześniejszym etapie.

W miarę jasny, aczkolwiek na pewno niepełny obraz reakcji zachodzących w czasie konsolidacji pamięci, najprawdopodobniej nie odnosi się do procesów rekonsolidacji. Dyskusja nad tym, czy rekonsolidacja jest powtórzeniem procesów konsolidacji pamięci czy też nie, rozgorzała na nowo kilka lat temu po publikacji Nader i wsp. (2000), w której

twierdzono, że za każdym razem, gdy pamięć jest reaktywowana staje się ona wrażliwa na czynniki amnezyjne i musi przechodzić ponownie proces konsolidacji by się umocnić. Wiele badań wskazuje jednak, że procesy te różnią się i nie można mówić o powtórnej konsolidacji, lecz o odrębnym procesie rekonsolidacji (Taubenfeld, i wsp., 2001; Alberini, 2005). Uważa się, że oba te procesy wymagają różnych mechanizmów molekularnych lub też, że zachodzą w różnych rejonach mózgu. Większość badań wskazuje na prawdziwość drugiego stwierdzenia, jak również na to, że przynajmniej część procesów molekularnych jest taka sama. W naszych badaniach wykazaliśmy, że aktywacja czynników transkrypcyjnych, procesy syntezy oraz glikozylacji białek niezbędne dla konsolidacji pamięci, są również wymagane przy jej rekonsolidacji, jednakże zachodzą w innym czasie i prawdopodobnie angażują inne rejony mózgu. Wrażliwość na czynniki amnezyjne również ulega modyfikacji. Wykazaliśmy, że u kurcząt poddanych treningowi niezwykle ważny jest czas, w jakim czynnik amnezyjny zostaje podany po reaktywacji pamięci. Podobnie ważny jest czas, jaki upłynął od treningu początkowego do reaktywacji pamięci, im jest on dłuższy, tym bardziej pamięć jest stabilna.

W oparciu o przedstawione wyniki można wysnuć bardziej ogólne wnioski dotyczące zarówno procesów związanych z konsolidacją pamięci, jak i jej rekonsolidacją:

- silny sygnał wapniowy, zapoczątkowany między innymi aktywacją receptorów aminokwasów pobudzających jest niezbędny do zainicjowania kaskady zdarzeń związanych z formowaniem pamięci. Na tym etapie niezbędny jest udział wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia,
- sygnał wapniowy, lecz o mniejszym natężeniu niezbędny jest również na późniejszym etapie formowania pamięci,
- mGluRs grupy I i II biorą udział w początkowych etapach formowania pamięci,
- procesy rekonsolidacji nie są prostym powtórzeniem tych, zachodzących podczas konsolidacji pamięci. Różnią się czasem oraz miejscem zachodzących reakcji.

Piśmiennictwo

- Alberini CM. (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* 28(1):51-6.
- Alkon DL, Nelson TJ, Zhao W, Cavallaro S (1998) Time domains of neural Ca²⁺ signaling and associative memory: steps through a calyculin, ryanodine receptor, K⁺ channel cascade. *Trends Neurosci.* 21: 529-537
- Anokhin KV, Tiunova AA, Rose SP. (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(11):1759-65.
- Bailey CH i Kandel ER (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Ann. Rev. Physiol.* 55:397-426
- Balschun D, Wetzel W. (1998) Inhibition of group I metabotropic glutamate receptors blocks spatial learning in rats. *Neurosci Lett.* 249(1):41-4.
- Bevilaqua LR, Rossato JI, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. (2003) Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behav Pharmacol.* 14(8):649-52.
- Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I. (1994) Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behav Pharmacol.* 5(3):356-359.
- Burchuladze R, Rose SPR (1992) Memory formation in day-old chicks requires NMDA but not non-NMDA glutamate receptors. *Eur. J. Neurosci.* 4: 533-538
- Carroll RC, Beattie EC, von Zastrow M, Malenka RC. (2001) Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2(5):315-24.
- Cartmell J, Schoepp DD. (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem.* 75(3):889-907.
- Cherkin A (1969) Kinetics of memory consolidation; role of amnestic treatment parameters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63: 1094-1101
- Christoffersen GR, Christensen LH, Hammer P, Vang M. (1999) The class I metabotropic glutamate receptor antagonist, AIDA, improves short-term and impairs long-term memory in a spatial task for rats. *Neuropharmacology.* 38(6):817-23.
- Clements MP, Rose SP, Tiunova A. (1995) omega-Conotoxin GVIA disrupts memory formation in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem.* 64(3):276-84.
- Crowe SF, Zhao WQ, Sedman GL, Ng KT. (1994) 2-deoxygalactose interferes with an intermediate processing stage of memory. *Behav Neural Biol.* 61(3):206-13.
- Csillag A (1999) Striato-telencephalic and striato- tegmental circuits: relevance to learning in domestic chick. *Behav. Brain res.* 98: 227-237

- Davis HP, Squire LR. (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull.* 96(3):518-59.
- Davis S, Butcher SP, Morris RGM (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* 12: 21-34
- De Blasi A, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F. (2001) Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 22(3):114-20.
- Flood JF, Baker ML, Davis JL (1990) Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonists and antagonists. *Brain. Res.* 521: 197-202
- Freeman FM, Rose SP, Scholey AB. (1995) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem.* 63(3):291-5.
- Heale V, Harley C (1990) MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze. *Pharmac. Biochem. Behav.* 36: 145-149
- Holscher C. (1994) Inhibitors of metabotropic glutamate receptors produce amnesic effects in chicks. *Neuroreport.* 5(9):1037-40.
- Ivanenko A, Baring MD, Airey JA, Sutko JL, Kenyon JL (1993) A caffeine and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in avian sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 70: 710-722
- Izquierdo I, Medina JH. (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68(3):285-316.
- Jerusalinsky D, Ferriera MBC, Waltz R, Da Silva RC, Bianchin M, Ruschel AC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I (1992) Amnesia by post training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex. *Behav. Neural. Biol.* 58: 76-80
- Kaba H, Hayashi Y, Higuchi T, Nakanishi S. (1994) Induction of an olfactory memory by the activation of a metabotropic glutamate receptor. *Science.* 265(5169):262-4.
- Kaczmarek L, Kossut M, Skangiel-Kramska J. (1997) Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. *Physiol Rev.*, 77(1):217-255
- Kossut M, Rose SP (1984) Differential 2-deoxyglucose uptake into chick brain structures during passive avoidance training. *Neurosci.* 12: 971-977
- Kozikowski AP, Steensma D, Araldi GL, Tuckmantel W, Wang S, Pshenichkin S, Surina E, Wroblewski JT. (1998) Synthesis and biology of the conformationally restricted ACPD analogue, 2-aminobicyclo[2.1.1]hexane-2,5-dicarboxylic acid-I, a potent mGluR agonist. *J Med Chem.* 41(10):1641-50.

- Manahan-Vaughan D. (1997) Group 1 and 2 metabotropic glutamate receptors play differential roles in hippocampal long-term depression and long-term potentiation in freely moving rats. *J Neurosci.* 17(9):3303-11.
- Matthies H. (1989) In search of cellular mechanisms of memory. *Prog Neurobiol.* 32(4):277-349.
- Micheau J, Riedel G (1999) Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci.* 55(4):534-48.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science.* 160(827):554-5.
- Mons N, Guillou JL, Jaffard R. (1999) The role of Ca²⁺/calmodulin-stimulable adenylyl cyclases as molecular coincidence detectors in memory formation. *Cell Mol Life Sci.* 55(4):525-33.
- Moser M-B, Trommald M, Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rat suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 12673-12675
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature.* 406:722-6
- Nakanishi S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron.* 13(5):1031-7.
- Ohno M, Watanabe S. (1998) Enhanced N-methyl-D-aspartate function reverses working memory failure induced by blockade of group I metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 240(1):37-40.
- Ohnuki T, Nomura Y. (1996) 1-[[[5-(4-nitrophenyl)-2-furanyl]-2-4-imidazolidinedione] (Dantrolene), an inhibitor of intracellular Ca²⁺ mobilization, impairs avoidance performance and spatial memory in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1038-1040
- Ouyang Y, Martone ME, Deerinck TJ, Airey JA, Sutko JL, Ellisman MH (1997) Differential distribution and subcellular localization of ryanodine receptor isoforms in the chicken cerebellum during development. *Brain Res.* 775: 52-62
- Packard MG, Vecchioli SF, Schroeder JP, Gasbarri A. (2001) Task-dependent role for dorsal striatum metabotropic glutamate receptors in memory. *Learn Mem.* 8(2):96-103.
- Pettit HO, Lutz D, Gutierrez C, Eveleth D. (1994) I.c.v. infusions of ACPD(1S,3R) attenuate learning in a Morris water maze paradigm. *Neurosci Lett.* 178(1):43-6.
- Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y. (2000) Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* 67(4):335-64.

- Przybylski J, Roulet P, Sara SJ. (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci.* 19(15):6623-8.
- Purcell AL, Carew TJ. (2003) Tyrosine kinases, synaptic plasticity and memory: insights from vertebrates and invertebrates. *Trends Neurosci.* Nov;26(11):625-30.
- Reyman KG (1991) Postsynaptic mechanisms of hippocampal long-term potentiation – the involvement of glutamate receptors and protein kinases in its late maintenance. In *Excitatory Amino Acids* (eds Meldrum BS, Moroni F, Simon RP and Woods JH), pp. 475-485. Raven, New York
- Rickard NS, Ng KT. (1995) Blockade of metabotropic glutamate receptors prevents long-term memory consolidation. *Brain Res Bull.* 36(4):355-9.
- Rickard NS, Poot AC, Gibbs ME, Ng KT. (1994) Both non-NMDA and NMDA glutamate receptors. *Behav Neural Biol.* 62(1):33-40.
- Riedel G, Platt B, Micheau J. (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res.* 140(1-2):1-47.
- Riedel G, Wetzel W, Reymann KG. (1996) Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation and in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 20(5):761-89.
- Riedel G. (1999) If phosphatases go up, memory goes down. *Cell Mol Life Sci.* 55(4):549-53.
- Rizzuto R (2001) Intracellular Ca²⁺ pools in neuronal signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 306-311
- Rogers LJ i Deng C (1999) Light experience and the lateralisation of two visual pathways in the chick. *Behav. Brain Res.* 88: 277-288
- Rose SP (1991) How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. *Trends Neurosci.* 14(9):390-7.
- Rose SP, Stewart MG. (1999) Cellular correlates of stages of memory formation in the chick following passive avoidance training. *Behav Brain Res.* 98(2):237-43.
- Rose SP (2000) God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learn Mem* 7: 1-17
- Sara SJ. (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.* 7(2):73-84.
- Salinska EJ, Chaudhury D, Bourne RC, Rose SP. (1999) Passive avoidance training results in increased responsiveness of voltage- and ligand-gated calcium channels in chick brain synaptoneuroosomes. *Neuroscience.* 93(4):1507-14.

- Sato T, Tanaka K, Ohnishi Y, Teramoto T, Irifune M, Nishikawa T. (2004) Inhibitory effects of group II mGluR-related drugs on memory performance in mice. *Physiol Behav.* 80(5):747-58.
- Schneggeburger T, Tempia F, Konnerth A (1993) Glutamate-mediated and AMPA-mediated calcium influx through glutamate-receptor channels in medial septal neurons. *Neuropharmacol.* 32: 1221-1228
- Stabuli U, Thibault O, DiLorenzo M, Lynch G (1989) Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. *Behav. Neurosci.* 103: 54-60
- Steele RJ, Stewart MG. (1995) Involvement of AMPA receptors in maintenance of memory for a passive avoidance task in day-old domestic chicks (*Gallus domesticus*). *Eur J Neurosci.* 7(6):1297-304.
- Stork O I Welzl H. (1999) Memory formation and the regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci* 55:575-592
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci.* 4(8):813-8.
- Tiunova AA, Anokhin KV, Rose SP. (1998) Two critical periods of protein and glycoprotein synthesis in memory consolidation for visual categorization learning in chicks. *Learn Mem.* 4(5):401-10.
- Verkhatsky A (2002) The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling. *Cell Calcium* 32: 393-404
- Woolf NJ (1998) A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol.* 55(1): 59-77
- Zengel JE, Sosa MA, Poage RE (1993) ω -Conotoxin reduces facilitation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Brain Res.* 611: 25-30
- Zhao W, Cavallaro S, Gusev P, Alkon DL. (2000) Nonreceptor tyrosine protein kinase pp60c-src in spatial learning: synapse-specific changes in its gene expression, tyrosine phosphorylation, and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* J97(14):8098-103.
- Zhao WQ, Benetti P, Rickard N, Sedman GL, Gibbs ME, Ng KT (1996) The involvement of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in memory formation in day-old chicks. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66: 24-35