

IZABELA FIGIEL, LESZEK KACZMAREK

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

UDZIAŁ WTÓRNYCH PRZEKAŹNIKÓW W PLASTYCZNOŚCI NEURONALNEJ

WPROWADZENIE

Plastyczność jest cechą układu nerwowego, która określa jego zdolność do ulegania względnie trwałym zmianom strukturalnym i funkcjonalnym pod wpływem przetwarzanych informacji. Informacje te, w postaci neuroprzekaźników, neuropeptydów, neurotrofin i innych neuromodulatorów docierają do swoistych receptorów na błonie komórki nerwowej. W wyniku ich pobudzenia dochodzi do aktywacji różnych układów wtórnego przekazywania. Zadaniem wtórnych przekazywaczy jest przeniesienie sygnału od błony komórkowej do wnętrza komórki, między innymi do jądra. Współczesna wiedza na ten temat jest ogromna. Ustalono, że wtórne przekazywacze zapoczątkowują całą kaskadę procesów biochemicznych zachodzących w cytoplazmie komórki. Za najważniejsze uważa się procesy fosforylacji (przeprowadzane przez enzymy nazywane kinazami białkowymi) i defosforylacji (katalizowane przez fosfatazy) różnych substratów białkowych. Zmienione w wyniku fosforylacji białko może zmienić zasadniczo swoją aktywność biologiczną wykonując na przykład ważne funkcje metaboliczne.

Opracowano także szereg modeli doświadczalnych pozwalających na badanie zjawisk, które zachodzą w obrębie pojedynczego neuronu, a prowadzą w rezultacie do reorganizacji sieci neuronalnej. W niniejszej pracy przedstawiono najpierw podstawowe (i z konieczności uproszczone) informacje na temat głównych szlaków wtórnego przekazywania, a następnie trzy modele plastyczności neuronalnej, najlepiej poznane pod względem udziału opisanych procesów.

PODSTAWOWE SZLAKI WTÓRNEGO PRZEKAŹNICTWA

Na błonie komórki nerwowej znajdują się liczne receptory odpowiedzialne za odbieranie sygnałów docierających w postaci neuroprzekaźników, neuropeptydów, neurotrofin i innych neuromodulatorów. Dla przeniesienia impulsu z jednej

komórki nerwowej na następną zasadnicze znaczenie mają neuroprzeźkaźniki wydzielone do szczeliny synaptycznej i działające na receptory jonotropowe błony postsynaptycznej.

Receptory jonotropowe to takie, które sprzężone są z kanałami jonowymi. Kanały te są zwykle swoiste i zdolne do przenoszenia z dużą wydajnością jedynie określonych jonów, przykładowo K^+ czy Ca^{2+} albo Cl^- . W wyniku otwarcia kanałów dla kationów jednowartościowych może dojść do depolaryzacji błony postsynaptycznej i wyzwolenia potencjału czynnościowego. Inne receptory tej grupy (związane z kanałami chlorkowymi) mogą przenosić jony zaangażowane w hyperpolaryzację błony i w rezultacie blokować aktywność elektryczną wywołaną w neuronie. Obok receptorów jonotropowych warto wspomnieć o kanałach jonowych zależnych od napięcia. Otwierają się one w rezultacie depolaryzacji wywołanej aktywnością receptorów jonotropowych.

Działanie wspomnianych receptorów i kanałów jest modulowane przez procesy zachodzące po pobudzeniu następnej dużej grupy białek błonowych — receptorów metabotropowych. Są one odpowiedzialne za powstawanie wtórnych przeźkaźników i w konsekwencji za bardziej trwałe niż depolaryzacja lub hyperpolaryzacja zmiany w komórce nerwowej.

Ca^{2+} JAKO WTÓRNY PRZEKAZNIK

Podział na receptory jonotropowe, kanały jonowe i receptory metabotropowe jest oczywiście uproszczeniem. Szczególnie dobrze to widać na przykładzie jonów Ca^{2+} . Wejście wapnia do komórki to, z definicji, efekt działania receptorów jonotropowych lub kanałów jonowych. Równocześnie jon wapniowy stanowi jeden z najważniejszych wtórnych przeźkaźników. Łączy się on bowiem z białkami wiążącymi wapń (szczególnie ważnym jest kalmodulina), a te aktywują określone kinazy białkowe (Means i Dedman 1980). Szczególnie dużo uwagi poświęca się ostatnio tak zwanej CamK II (calcium-calmodulin dependent kinase type II — kinaza II zależna od wapnia i kalmoduliny). Substratami dla Cam K II jest wiele białek komórkowych, w tym i białko zwane CREB (patrz niżej), które jest czynnikiem transkrypcyjnym, regulującym ekspresję genów w jądrze komórkowym (Ginty i in. 1992). Tak więc, podwyższenie cytoplazmatycznego poziomu wapnia może powodować różnorodne efekty. Trzeba także podkreślić, że jest bardzo ważne, jaką drogą dochodzi do wzrostu stężenia Ca^{2+} . Z jednej strony może to być wynikiem otwarcia receptorowych kanałów jonowych, czyli kanałów zależnych od ligandów. Może to być też konsekwencją otwarcia kanałów zależnych od napięcia, otwieranych w rezultacie depolaryzacji błony (tzw. kanały typu L) (Murphy i in. 1991).

Szczególnie ważnym w procesach plastycznych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) jest kanał receptora NMDA. Receptor ten, pobudzany endogennie przez L-glutaminian (L-glu), główny neuroprzeźkaźnik pobudzający, ma niestychające ciekawe własności. Otwarcie sprzężonego z nim kanału jonowego wymaga

zarówno interakcji z ligandem (L-glu), jak i niemal równoczesnej depolaryzacji. Ta ostatnia usuwa z wnętrza kanału jony Mg^{2+} , które blokują go w okresie spoczynkowym (Kandel i O'Dell 1992). Warto zwrócić uwagę, że wymaganie dwóch czynników aktywacji (ligand + depolaryzacja) czyni z receptora NMDA detektor zbierający informację z dwóch różnych źródeł (coincidence detector). Jest on zatem miejscem integracji informacji, a procesy integracji informacji leżą niewątpliwie u podłoża zmian plastycznych.

Kolejną drogą prowadzącą do wzrostu poziomu wolnego wapnia w cytoplazmie neuronu jest uwolnienie tego jonu z magazynów wewnątrzkomórkowych. Zaangażowane są tu dwa rodzaje receptorów umieszczonych w błonie siateczki śródplazmatycznej: receptor trisfosfoinozytolowy (IP_3) i receptor rianodynowy (Poddana i Barańska 1991, Henzi i MacDermott 1992). Trzeba zwrócić uwagę, że dla komórki nie jest obojętne, kiedy i na jakiej drodze dojdzie do zmian w poziomie cytoplazmatycznego Ca^{2+} . Mikrokompartimentacja, czyli bardzo zróżnicowane ułożenie składników cytoplazmy, w tym i substratów dla odpowiednich kinaz powoduje, że lokalny wzrost stężenia wolnego wapnia w cytoplazmie wywołuje bardzo selektywne zmiany w funkcjonowaniu neuronu.

WTÓRNE PRZESYŁACZNIKI POWSTAJĄCE W WYNIKU PRZEMIAN LIPIDOWYCH

Lipidy stanowią zasadniczy składnik błony komórkowej i nic dziwnego, że zaangażowane są w powstawanie w jej okolicach wtórnych przeszylników. Najlepiej poznanym procesem tego rodzaju jest zależny od aktywacji swoistych receptorów rozpad bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2) (Barańska 1992). Związek ten pod wpływem działania fosfolipazy C ulega podziałowi na trisfosforan inozytolu (IP_3) i diacylglicerol. Rolą IP_3 jest uwolnienie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych (patrz wyżej). Natomiast diacylglicerol aktywuje kinazę białkową C (PKC) (Berridge i Irvine 1989). Należy podkreślić uproszczenie przedstawionego opisu. Istnieje bowiem kilka form fosfolipazy C i jeszcze więcej izoform kinazy C (Nishizuka 1992). Stwarza to bardzo duże możliwości regulacji i integracji informacji.

PIP_2 nie jest jedynym błonowym lipidem zaangażowanym w wytwarzanie wtórnych przeszylników. Wśród innych jest na przykład fosfatydylocholina, której rozpad także uwalnia diacylglicerol (Exton 1990). Indukowany aktywacją receptorów metabolizm lipidów błonowych prowadzi do wytworzenia kolejnych substancji sygnałowych. Są wśród nich kwas arachidonowy i inne prekursorzy prostaglandyn.

CYKLICZNE NUKLEOTYDY JAKO WTÓRNE PRZESYŁACZNIKI

Najbardziej klasycznym wtórnym przeszylnikiem jest oczywiście cykliczny adenylinomonofosforan (cAMP). Związek ten powstaje pod wpływem cyklazy adenylinowej (znowu mamy do czynienia z jej różnymi izoformami). Aktywność tego enzymu jest regulowana przez zależne od receptorów białka G. Do niedawna

sądzono, że mechanizm pobudzenia białek G polega na ich dysocjacji na aktywną podjednostkę alfa (jest jej wiele rodzajów o różnej funkcji, na przykład hamującej cyklazę lub pobudzającej) i nieaktywny kompleks podjednostek beta i gamma (Simon i in. 1991). Ostatnio okazało się, że jest to bardziej skomplikowane. Cyklaza adenylanowa typu II jest na przykład hamowana przez zależną od aktywacji receptora GABA_B podjednostkę G alfa o charakterze inhibitorowym (G_i). Pobudzenie receptora prowadzi także do uwolnienia podjednostek G beta i gamma. Z kolei noradrenalina działając na receptor β -adrenergiczny powoduje uwolnienie podjednostki G alfa stymulującej działanie cyklazy (G_s). Jednoczesne pobudzenie obu wspomnianych receptorów objawia się wzmożoną aktywacją, a nie hamowaniem cyklazy (Bourne i Nicoll 1993). Należy zauważyć, że jest to kolejny przykład narzędzia molekularnego umożliwiającego integrację informacji (coincidence detector).

Powstający w wyniku opisanych powyżej procesów cAMP swoiście pobudza kinazę białkową A (PKA, też występuje w różnych izoformach). Wśród jej substratów znajduje się białko CREB (cAMP responsive element binding protein) (Ginty i in. 1992). Jak wspomniano powyżej jest to czynnik transkrypcyjny. I znowu trzeba podkreślić, że może on służyć jako detektor równoczesnych informacji, albowiem stanowi substrat dla dwóch różnych kinaz: A i CamK II, a wykazano, że podwójna fosforylacja CREBa zwiększa jego aktywność jako regulatora ekspresji genów (Dash i in. 1991).

Obok cAMP, innym cyklicznym nukleotydem spełniającym rolę wtórnego przekaźnika jest cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP). Powstaje on w wyniku działania cyklazy guanylanowej, a układem efektorowym może być kinaza G (Garthwaite 1991).

GAZOWE PRZKAŹNIKI INFORMACJI

Ostatnio dużo uwagi poświęca się roli tlenu azotu (NO) jako substancji sygnałowej, a pojawiły się także doniesienia, że podobne funkcje może spełniać tlenek węgla (CO) (Garthwaite 1991).

Tlenek azotu powstaje w wyniku działania syntazy NO. W neuronach enzym ten jest stale obecny i jego aktywacja prowadzi do uwolnienia bardzo krótko działającego przekaźnika, jakim jest NO. Warto zwrócić uwagę, że związek ten może bardzo łatwo przenikać przez błonę komórkową i działać poza miejscem syntezy.

KINAZY TYROZYN

Głównym sposobem inicjowania procesów rozprzestrzeniania informacji wewnątrz komórki jest powstanie wtórnych przekaźników i zależne od ich obecności pobudzanie kinaz białkowych. Istnieją również kinazy aktywowane, jak się wydaje, bez udziału wtórnych przekaźników — bezpośrednio w wyniku pobudzenia receptorów. Taki charakter mają kinazy tyrozynowe. Wszystkie wspomniane

poprzednio kinazy fosforylują w białkach reszty serynowe i treoninowe. Ufosforylowana tyrozyna stanowi rzadkość w komórce — zaledwie ułamek procenta wszystkich ufosforylowanych reszt aminokwasowych. W neuronach wykryto wiele kinaz tyrozynowych, ale funkcja większości z nich nie jest poznana. Są wśród nich kinazy stanowiące fragment receptorów oraz kinazy podbłonowe, o których sądzi się, że mogą wchodzić w asocjacje z pobudzonymi receptorami. Wiadomo, że receptory neurotrofin takich jak: NGF, BDNF, HDNF mają własności kinaz tyrozynowych (Ullrich i Schlessinger 1990). Z kolei pobudzenie receptora NMDA powoduje zwiększoną fosforylację reszt tyrozynowych, choć kinaza zależna od tego receptora nie jest poznana (Bading i Greenberg 1991).

Po omówieniu zasad wtórnego przekąźnictwa możemy przejść do przedstawienia wybranych przykładów udziału tych procesów w uczeniu się.

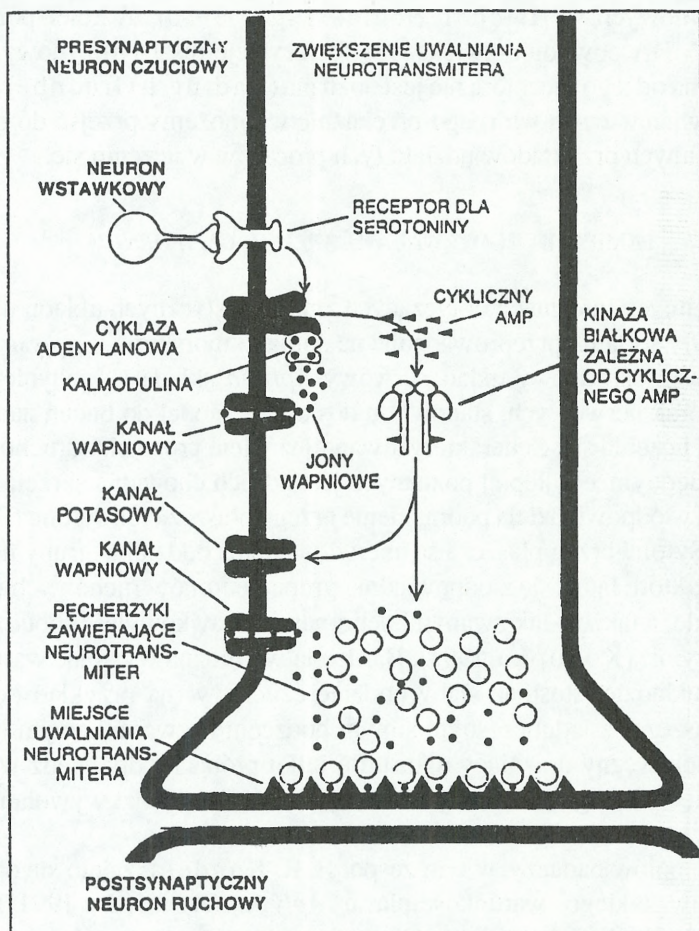
PAMIĘĆ DŁUGOTRWAŁA U *APLYSIA CALIFORNICA*

Wiele cennych informacji dotyczących zmian plastycznych układu nerwowego dostarczyły badania przeprowadzone na ślimaku morskim — *Aplysia californica*. Ponieważ ośrodkowy układ nerwowy *Aplysia* składa się jedynie z około 20000 komórek nerwowych, stanowi on doskonały model do badań nad komórkową naturą uczenia się. Scharakteryzowano już wiele prostych odruchów u tego zwierzęcia. Jednym z najlepiej poznanych jest odruch chowania skrzela do jamy płaszczowej w odpowiedzi na podrażnienie brzegu płaszczu lub syfonu (Pinsker i in. 1969). Syfon i brzeg płaszczu są unerwione przez oddzielne grupy neuronów czuciowych, które łączą się z odpowiednią grupą neuronów ruchowych unerwiających skrzele, a także z tak zwanymi neuronami wstawkowymi (pobudzającymi lub hamującymi) (Konopka 1991). Bardzo łatwo można wywołać warunkowanie w tym układzie, stosując słaby bodziec czuciowy (na przykład dotknięcie brzegów płaszczu) z jednoczesnym silnym bodźcem bezwarunkowym (na przykład szok elektryczny drażniący ogon). Po kilku próbach odpowiedź wywołana przez dotknięcie brzegu płaszczu jest silniejsza od odpowiedzi wywołanej przez, na przykład, dotknięcie syfonu.

Kilka zespołów badaczy, w tym zespół E. R. Kandela, zajęło się opisaniem mechanizmów takiego warunkowania u *Aplysia* (Konopka 1991, Kandel i Schwartz 1982). Obecnie wiadomo, że pobudzenie neuronów czuciowych unerwiających brzeg płaszczu powoduje powstanie potencjału czynnościowego w neuronach wstawkowych i neuronach ruchowych. Aktywacja tych ostatnich prowadzi do szybkiego cofnięcia skrzela. Odruch ten ulega wzmocnieniu pod wpływem podawanego na ogon zwierzęcia bodźca bezwarunkowego, który z kolei powoduje aktywację kilku zespołów neuronów wstawkowych mających wpływ na ruch skrzela. Pobudzenie neuronów wstawkowych powoduje uwolnienie neuroprzekąźnika — serotoniny. Co więcej, uwalnianie to zwiększa się, jeśli bodziec bezwarunkowy był podawany tuż po wzbudzeniu potencjału czynnościowego.

wego w neuronie czuciowym. Zjawisko to nazwano torowaniem (ułatwianiem) presynaptycznym (presynaptic facilitation) (Konopka 1991).

Serotonina łączy się ze swoim receptorem na błonie presynaptycznej neuronu czuciowego i poprzez białko G (Chin i in. 1990) pobudza cyklazę adenylanową (Konopka 1991). Enzym ten przeprowadza reakcję syntezy cyklicznego AMP z ATP. Cykliczny AMP służy następnie jako przekaźnik wtórny i aktywuje kinazę białkową A (rys. 1).



Rys. 1. Schemat procesów biochemicznych związanych z procesami uczenia się u *Aplysia californica*. Na podstawie: Kandel E. R., Hawkins R. D., Świat Nauki, 1992, 11, 55 (zmienione).

Jednym z substratów dla tego enzymu jest białko kanału potasowego (lub inne białko regulujące aktywność tego kanału). Fosforylacja powoduje zamknięcie kanału, a w konsekwencji utrzymywanie się depolaryzacji błony neuronu presynaptycznego. W związku z tym dłużej pozostają otwarte zależne od napięcia kanały wapniowe i więcej wapnia napływa do komórki (Comar do i in. 1986). Tutaj jest

on wiązany przez kalmodulinę i w takiej formie aktywuje cyklazę adenylanową (Means i Dedman 1980). Ten właśnie proces leży u podstaw zjawiska torowania presynaptycznego. Wykazano, że zmiana potencjału czynnościowego w neuronie czuciowym jest związana z prądem wapniowym (Konopka 1991). Powstały kompleks kalmodulina-wapń, stymulując cyklazę adenylanową, powoduje zwiększenie syntezy cyklicznego AMP i w rezultacie wzmożoną aktywację kinazy białkowej A. Równocześnie ulega także wzbudzeniu kinaza białkowa zależna od kalmoduliny i wapnia (CamK II). Enzym ten fosforyluje białka odpowiedzialne za tworzenie pęcherzyków synaptycznych i uwalnianie neuroprzekąźnika (Kelly 1993) (rys. 1).

Opisany wyżej mechanizm warunkowania u *Aplysia* stanowi podstawę średniotrwałych (trwających do kilku godzin) zmian na poziomie komórkowym. Długotrwałe wzmocnienie transmisji synaptycznej wymaga trwałych zmian, związanych z tworzeniem nowych połączeń synaptycznych i zwiększeniem ilości uwalnianego neuroprzekąźnika. Okazuje się, że pamięć długotrwałą można zablokować przez podanie zwierzętom (w odpowiednim przedziale czasowym — od 1/2 godz. do 2 godzin po stymulacji) inhibitorów syntezy mRNA i białka (Montarolo i in. 1986). Nowe białka modyfikują właściwości kinazy białkowej A, przez co powodują stały wzrost fosforylacji innych białek. Mogą do nich należeć białka jądrowe, takie jak czynniki transkrypcyjne. Mają one zdolność do wiązania się z DNA w rejonie promotorów wielu genów i w ten sposób regulują ich transkrypcję (Skangiel-Kramska i Kaczmarek 1992). Jednak dokładne poznanie mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za długotrwałe zmiany w transmisji synaptycznej u *Aplysia*, wymaga jeszcze wielu badań.

JEDNOPRÓBOWE UCZENIE U KURCZĄT

Ponad dwadzieścia lat temu A. Cherkin opisał test jednopróbowego unikania u kurcząt, który stał się bardzo popularnym modelem doświadczalnym pozwalającym na badanie uczenia u kręgowców (Cherkin 1969). Młode kurczęta spontanicznie dziobią małe przedmioty znajdujące się w ich polu widzenia. Jeśli takim przedmiotem jest kolorowe ziarenko zwilżone gorzką cieczą, kurczę po jednorazowej próbie unika dziobania ziarenka takiego samego koloru, nawet gdy nie jest ono gorzkie. Co więcej, powstały ślad pamięciowy utrzymuje się przez wiele godzin.

Jakie są molekularne i komórkowe podstawy tej formy uczenia? Próbę odpowiedzi na to pytanie podjął zespół S. P. R. Rose'a. Obecnie wiadomo, że zjawiska zachodzące w komórce nerwowej podczas testu jednopróbowego unikania prowadzą się do całej kaskady procesów biochemicznych (Rose 1991). Powstanie potencjału czynnościowego w presynaptycznym zakończeniu nerwowym objawia się między innymi krótkotrwałym wzrostem fosforylacji białka B-50 (znane także jako gap43, F1, p-57). Wykazano, że białko to reguluje wydzielanie neuro-

przebieżników. Enzymem przeprowadzającym reakcję fosforylacji jest kinaza białkowa C, zależna od wapnia i diacylglicerolu. Występuje ona zarówno w cytoplazmie, jak i w formie związanej z błoną cytoplazmatyczną. Wyniki badań, w których zastosowano przeciwciała przeciwko odpowiednim izoformom kinazy C, pozwoliły na stwierdzenie, że do fosforylacji białek związanych z błoną konieczne jest przemieszczenie enzymu z cytoplazmy do błony (Akers i in. 1986). Inhibitory kinazy, takie jak staurosporyna i mniej specyficzny — H-7 (ma także wpływ na działanie innych kinaz, na przykład CamK II), powodują zanik powstałego śladu pamięciowego (Rose 1991). Wciąż brakuje danych o roli innych kinaz białkowych w opisywanym modelu doświadczalnym.

Równolegle z procesami fosforylacji białek, w jądrze komórkowym zachodzi wzmożona ekspresja proto-onkogenów *c-fos* i *c-jun*, które należą do rodziny tak zwanych wczesnych genów (Anokhin i in. 1991). Produkty białkowe tych genów — to znane nam już czynniki transkrypcyjne wpływające na transkrypcję innych genów.

Opisane wyżej procesy zachodzą w neuronach w ciągu kilku minut po treningu. Dalszym etapem prowadzącym już bezpośrednio do trwałych zmian w morfologii złącz synaptycznych jest synteza nowych białek (Mileusnic i in. 1980). Wśród nich bardzo ważną klasą są glikoproteiny — białka zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej, wiążące łańcuch złożony z cząsteczek glukozy, fukozy i galktozy. Istotną funkcją tych białek jest stabilizacja połączeń międzykomórkowych. Zastosowanie 2-deoksygalktozy — inhibitora procesu glikozylacji, potwierdziło udział glikoprotein w tworzeniu trwałego śladu pamięciowego w wyniku jednorobowego uczenia się u kurcząt (Rose 1991).

LTP JAKO NEURONALNY MODEL PAMIĘCI

W 1973 roku T. V. P. Bliss i T. Lomo stwierdzili, że wywołanie krótkiej serii potencjałów czynnościowych o wysokiej częstotliwości (tetanizacja) w pewnym szlaku neuronalnym w hipokampie, powoduje wzrost siły połączeń synaptycznych w obrębie tego szlaku. Nazwali oni to zjawisko długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (long-term potentiation — LTP) (Bliss i Lomo 1973). LTP utrzymuje się przez godziny, a czasem nawet dni i tygodnie. Warunkiem powstania LTP jest jednoczesna depolaryzacja w komórce pre- i postsynaptycznej. Z zakończenia presynaptycznego jest uwalniany neuroprzebieżnik (w tym przypadku jest nim kwas glutaminowy), który wiąże się ze swoim receptorem na błonie komórki postsynaptycznej.

Wyróżnia się często występowanie dwóch typów receptorów jonotropowych dla glutaminianu: receptory NMDA (nazwa pochodzi od kwasu *N*-metylo-D-asparaginowego, który też wiąże się z tymi receptorami) i receptory nie-NMDA. Normalne przewodnictwo synaptyczne zachodzi przez kanały nie-NMDA, ponieważ, jak wspomniano na początku, kanał jonowy związany z receptorem NMDA

jest zablokowany przez jony magnezowe. Dopiero depolaryzacja komórki postsynaptycznej powoduje otwarcie tego kanału. Optymalny stan depolaryzacji jest osiągnany tylko wówczas, gdy jednocześnie występujące pobudzenie wielu neuronów presynaptycznych wywołuje aktywację wielu receptorów nie-NMDA na komórce docelowej. Zatem do otwarcia kanału jonowego, związanego z receptorem NMDA, są wymagane dwa warunki: receptor musi wiązać kwas glutaminowy oraz komórka postsynaptyczna musi być zdepolaryzowana. Otwarcie kanału jonowego powoduje napływ jonów wapnia do komórki, który inicjuje LTP przez aktywację co najmniej trzech różnych typów kinaz białkowych (Bliss i Collingridge 1993).

Doświadczenia, w których wykorzystano inhibitory tych enzymów wskazują na ogromne znaczenie w zjawisku LTP kinazy białkowej C (PKC). Sfingozyna, inhibitor regulatorowej podjednostki kinazy C, uniemożliwia indukcję LTP, nie mając wpływu na proces jego utrzymywania. Inhibitor podjednostki katalitycznej tego enzymu — H-7 uniemożliwia zarówno indukcję, jak i utrzymywanie LTP (Wang i Feng 1992, Malinow i in. 1988). Wyniki tych badań są jednak kontrowersyjne zważywszy na fakt małej selektywności stosowanych substancji blokujących.

Nie ma także zgodności co do tego, czy stała aktywność kinazy, która może być konieczna do zaistnienia LTP, jest zlokalizowana w komórce postsynaptycznej. Ostatnio dominuje pogląd, że jedna z izoform tego enzymu — izoforma γ — jest aktywna po tetanizacji w komórce postsynaptycznej przez kilka minut, podczas gdy izoforma β , występująca w komórce presynaptycznej, zachowuje swoją aktywność nawet przez 1 godzinę (Huang i in. 1992). Wstrzyknięcie do komórki podjednostki katalitycznej kinazy C indukuje wzmocnienie synaptyczne (Hu i in. 1987), podobnie jak zewnątrzkomórkowe podanie aktywatorów enzymu, takich jak estry forbolu (imitujące działanie diacylglicerolu). Odplukanie estrów forbolu znosi jednak ten efekt wzmocnienia (Malenka i in. 1985).

A. Routtenberg (1986) obserwował wzrost fosforylacji białka B-50 w wyniku wywołania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego. W dodatku podwyższony poziom fosforylacji tego białka utrzymywał się nawet po trzech dniach od momentu indukcji LTP. Wiadomo, że białko B-50 jest substratem dla kinazy białkowej C. Ponadto wyniki wielu badań wskazują na to, że PKC wpływa na aktywację receptora NMDA. Przykładem może być zastosowanie estrów forbolu, które selektywnie wzmacniają odpowiedź receptora NMDA w neuronach piramidowych pola CA1 hipokampa (Bliss i Collingridge 1993). Podobnie stymulacja receptorów muskarynowych (cholinergicznych) czy metabotropowych dla glutaminianu, które aktywują kinazę białkową C, także wpływa na wzrost odpowiedzi receptora NMDA (Fisher i in. 1983). Nasuwa się przypuszczenie, że kwas glutaminowy działając na jeden ze swoich receptorów (metabotropowy) może wpływać na aktywację innego receptora (NMDA) poprzez kinazę białkową C. Co więcej, acetylocholina i inne neuroprzekážniki, które odgrywają ważną rolę

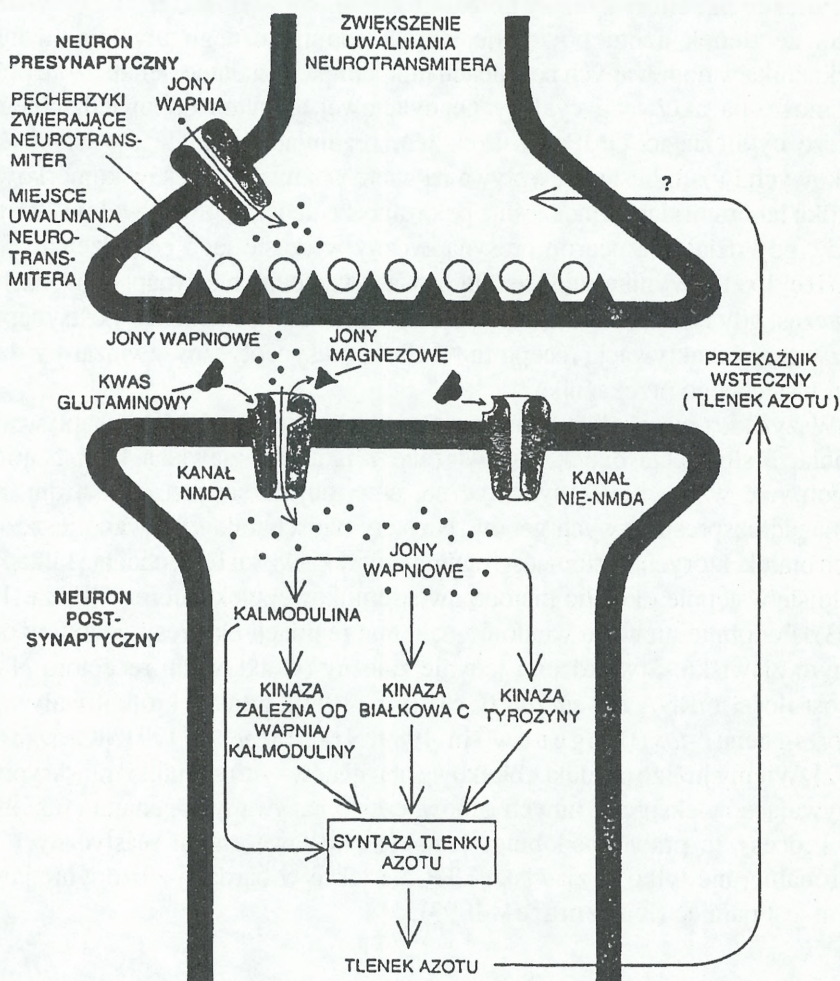
w procesach pamięci, mogą modulować szlak NMDA poprzez PKC. Jeśli PKC wzmacnia odpowiedź receptora NMDA, a poziom aktywacji tego receptora określa próg indukcji LTP, to neuroprzekazniki, które aktywują PKC powinny redukować ten próg. Hipoteza ta została ostatnio potwierdzona. Zastosowanie selektywnego agonisty receptora metabotropowego dla L-glu (trans-ACPD) łącznie z taką tetaniczną stymulacją, która indukuje jedynie krótkotrwałe wzmocnienie synaptyczne (STP), powoduje wywołanie LTP. Ta metabotropowa forma LTP jest blokowana przez antagonistów receptora NMDA i inhibitory kinazy białkowej C (Bliss i Collingridge 1993).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że jakkolwiek aktywacja kinazy białkowej C nie jest wystarczająca do samej indukcji LTP, to wydaje się być konieczna do zamiany STP w LTP. Proces ten może wymagać złożonej aktywacji receptorów kilku typów (glutaminianowych: NMDA i metabotropowych oraz cholinergiczych). Dopiero zastosowanie bardziej selektywnych inhibitorów PKC pozwoli na sprawdzenie tej hipotezy.

Innym wtórnym przekaznikiem działającym podczas długotrwałego wzmocnienia synaptycznego jest kinaza zależna od kalmoduliny i wapnia — CaM II. Wstrzyknięcie do komórek piramidowych pola CA1 hipokampa nieselektywnego inhibitora kinazy — H-7 lub antagonisty kalmoduliny (kalmidazolu) znosi zjawisko LTP (Malenka i in. 1989). Podobny efekt wywołuje zastosowanie syntetycznych peptydów, które działając jako antagoniści kalmoduliny znoszą zdolność do fosforylacji białek przez kinazę CaM II (Kelly i in. 1988). Ostatnio przeprowadzone badania, w których wykorzystano techniki inżynierii genetycznej, dostarczyły nowych ciekawych informacji. Okazuje się, że usunięcie genu kodującego izoformę α kinazy CaM II, która obficie występuje w postsynaptycznych zakończeniach nerwowych, kilkakrotnie osłabia, chociaż nie znosi zupełnie, zdolność do wytwarzania LTP (Silva i in. 1992). Autofosforylowana forma kinazy CaM II nie wymaga obecności jonów wapnia i w rezultacie pozostaje ciągle aktywna (Kato i Fujisawa 1991). Stąd też zrodziło się przypuszczenie, że enzym ten może stanowić swoistą pamięć molekularną, która zarejestrowała wystąpienie chwilowego wzrostu stężenia jonów wapnia (Lisman i Goldring 1988). Niestety jak dotąd nie stwierdzono, żeby aktywacja receptora NMDA wpływała na poziom ufosforylowanej formy CaMK II w komórce.

Znacznie mniej wiadomo o roli innych kinaz w zjawisku LTP. Stwierdza się na przykład, że poziom cyklicznego AMP wzrasta w sposób zależny od aktywacji receptora NMDA, co sugeruje udział kinazy A w opisywanym zjawisku (Bliss i Lynch 1988). Ponadto kinaza A reguluje napływ wapnia przez kanał jonowy związany z niektórymi podjednostkami receptorów jonotropowych dla glutamianu typu nie-NMDA (tak zwanego receptora kainianowego) (Keller i in. 1992). Z kolei za udziałem kinazy tyrozyny w powstawaniu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego przemawiają wyniki badań, w których wykazano, że aktywacja receptora NMDA prowadzi do fosforylacji na tyrozynie kinazy MAP-2 (Bading

Greenberg 1991). Ponadto zastosowanie substancji blokujácych działánie kinazy tyrozyny (takich jak lavendustin A i genisteina) uniemożliwia wywołánie LTP na skrawkach hipokampa (O'Dell i in. 1991). Ostatnio E. R. Kandel wraz ze współpracownikami wykazali, że u myszy z usuniętym selektywnie genem kodujácym podbłonowá kinazé tyrozynowá zwaná *fin* występuje zaburzenie wywołwania LTP. Co ciekawe, mutacje w genach kodujácych inne kinazy tyrozynowe (*src*, *yes*, *abl*) nie wpłynęły na wywołwanie LTP (Grant i in. 1992).



Rys. 2. Schemat procesów biochemicznych związanych z powstawaniem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w hipokampie szczura. Kandel E. R., Hawkins R. D., Świat Nauki, 1992, 11, 58 (zmienione).

Indukcja LTP przebiega zatem w sposób następujący (rys. 2). W wyniku depolaryzacji komórki postsynaptycznej napływają jony wapniowe, które aktywują przekáźniki wtórne — kinazy białkowe. Natomiast utrzymywanie się LTP jest

spowodowane zwiększeniem uwalniania neuroprzebieżników z neuronu presynaptycznego. Musi zatem istnieć jakiś czynnik będący łącznikiem między komórką post- i komórką presynaptyczną. Większość badaczy podziela pogląd, że takim czynnikiem, spełniającym wymagania wstecznego przebieżnika w zjawisku LTP, może być tlenek azotu (Garthwaite 1991, O'Dell i in. 1991). Tlenek azotu powstaje z argininy w reakcji katalizowanej przez enzym — syntazę tlenku azotu, który, co warto podkreślić, do swej aktywności wymaga kalmoduliny i wapnia. Specyficzne inhibitory syntazy tlenku azotu zapobiegają indukcji LTP. Wiadomo także, że tlenek azotu powoduje wzrost spontanicznego uwalniania neuroprzebieżnika w hodowanych neuronach hipokampa. Działanie tlenku azotu polega, być może, na aktywacji cyklicznej guanylanowej, enzymu odpowiedzialnego za syntezę cyklicznego GMP. Związek ten, regulując działanie swoistych kinaz białkowych i fosfodiesteraz, wpływa na wiele ważnych procesów komórkowych. W kilku laboratoriach jednocześnie pokazano, że tlenek azotu wywołuje LTP tylko wtedy, gdy działa na neuron presynaptyczny w czasie jego pobudzenia (Garthwaite 1991). Wynika stąd, że długotrwałe wzmocnienie synaptyczne zachodzi wówczas, gdy istnieją dwa nakładające się na siebie mechanizmy: postsynaptyczny, związany z aktywacją receptora NMDA i presynaptyczny, związany z działaniem wstecznego przebieżnika.

Wszystkie opisane dotąd procesy: aktywacja receptora NMDA, napływ jonów wapnia, fosforylacja białek, są związane z indukcją zjawiska LTP. Natomiast długotrwałe wzmocnienie synaptyczne, utrzymujące się przez kilka dni, może wymagać ekspresji nowych genów. Niestety nie scharakteryzowano jeszcze nowych białek, których poziom jest regulowany w zjawisku LTP, chociaż kilka z nich udało się wstępnie określić metodą dwukierunkowej elektroforezy (Fazell i in. 1993). Podobnie niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji genów w opisywanym zjawisku. Stwierdzono jedynie zależność od aktywacji receptora NMDA wzrost ilości mRNA dla *zif/268* (Cole i in. 1989), a także krótkotrwały wzrost ekspresji genu *c-fos* (Dragunow i in. 1989, Nikolaev i in. 1991, Kaczmarek 1992). Wiemy już, że produkty białkowe obu genów — to czynniki transkrypcyjne, wpływające na ekspresję innych genów, często nazywanych genami efektorowymi. Procesy te prawdopodobnie stanowią podstawę zmian plastycznych sieci neuronalnej nie tylko w zjawisku LTP, ale także w bardziej złożonym zjawisku jakim jest pamięć (Kaczmarek 1993).

PODSUMOWANIE

Jeszcze do niedawna wielką zagadką dla neurobiologów były procesy związane z uczeniem się i pamięcią. Chociaż wysuwano hipotezy łączące te procesy ze zmianami morfologicznymi i fizjologicznymi w obrębie złączy synaptycznych, to jednak nie dyskutowano ich podłoża molekularnego (Hebb 1949, Konorski 1948). Obecnie wiadomo, że pobudzenie komórki nerwowej, objawiające się

zmianą jej potencjału błonowego, wywołuje szereg reakcji biochemicznych zachodzących w cytoplazmie, które prowadzą do uwolnienia swoistego neuroprzekaźnika (tzw. zwanego przekaźnika pierwszorzędowego). Neuroprzekaźnik łączy się ze swoim receptorem na błonie komórki docelowej i aktywuje swoiste przekaźniki wtórne, które znowu poprzez kaskadę procesów biochemicznych, przenoszą sygnał do jądra komórki nerwowej. Wydaje się, że kluczową rolę w przekaźnictwie wtórnym odgrywają jony wapniowe i cykliczny AMP, ponieważ powodują aktywację kinaz białkowych, enzymów odpowiedzialnych za procesy fosforylacji zachodzące w komórce. Zastosowanie substancji blokujących działanie kinaz białkowych ujawniło związek procesów fosforylacji z plastycznością neuronalną.

W artykule tym szerzej omówiono działanie kinaz białkowych na poziomie wtórnego przekaźnictwa. Mówiąc jednak o trwałych zmianach sieci neuronalnej, związanych z integracją różnych informacji docierających ze środowiska, należało także wspomnieć o roli tych enzymów w procesach zachodzących w jądrze komórkowym. Coraz więcej danych wskazuje na to, że fosforylacja może być konieczna do aktywacji czynników transkrypcyjnych, uważanych za przekaźniki trzeciorzędowe. Regulując ekspresję genów, wpływają one pośrednio na wzrost siły połączenia synaptycznego, co stanowi podstawę utrwalania powstałego śladu pamięciowego (Skangiel-Kramska i Kaczmarek 1992)

SECOND MESSENGERS IN NEURONAL PLASTICITY

Summary

Understanding of molecular bases of neuronal plasticity, including learning and memory formation, comprises a formidable challenge for the contemporary neuroscience. Recent advances in molecular biology of the cell provided suitable tools and models to approach this problem. This paper is divided into two parts. The first one provides background information on the main routes of neuronal signal transduction from the cell surface (neurotransmitter receptors), through second messengers and specific kinases to setting up specific intracellular effector systems. The second part of the paper reviews most recent achievements in linking specific signal transduction pathways with neural plasticity, as exemplified by three model systems: strengthening of synaptic efficacy in *Aplysia californica* neurons in culture, acquisition of passive avoidance response in chicks and long term potentiation. The main conclusion derived from these studies is that in the last years it has been possible to document that different learning-related phenomena are based on integration of information carried out by second messengers. However, specific pathways utilized may differ from one system to another.

LITERATURA

- Akers R. F., Lovinger D. M., Colley P. A., Linden D. J., Routtenberg A., 1986. *Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation*. Science, 231, 587-589.

- Anokhin K. V., Mileusnic R., Shamakina J. Y., Rose S. P. R., 1991. *Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain*. Brain Res., 544, 101–107.
- Bading H., Greenberg M. E., 1991. *Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation*. Science, 253, 912–913.
- Barańska J., 1992. *Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce*. Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa.
- Berridge M., Irvine R. F., 1989. *Inositol phosphates and cell signalling*. Nature (London), 341, 197–205.
- Bliss T. V. P., Collingridge G. L., 1993. *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. Nature (London), 361, 31–39.
- Bliss T. V. P., Lomo T., 1973. *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path*. J. Physiol., 232, 331–356.
- Bliss T. V. P., Lynch M. A., 1988. *Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus: Properties and mechanisms*. Neurology and Neurobiology. Allan R. Liss, Inc., New York, 35, 3–72.
- Bourne H. R., Nicoll R., 1993. *Molecular machines integrate coincident synaptic signal*. Cell, 72/Neuron, 10 (Suppl.), 65–75.
- Cherkin A., 1969. *Kinetics of memory consolidation: Role of amnesic treatment parameters*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 1094–1100.
- Chin G. J., Vogel S. S., Elste A. M., Schwartz J. H., 1990. *Characterization of synaptophysin and G protein in synaptic vesicles and plasma membrane of Aplysia californica*. Brain Res., 508, 265–272.
- Cole A. J., Staffen D. W., Baraban J. M., Worley P. F., 1989. *Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation*. Nature (London), 340, 474–476.
- Comardo J. S., Schuster M. J., Siegelbaum S., 1986. *Modulation of a potassium channel in Aplysia sensory neurons: Role of protein phosphorylation*. Molecular Aspects of Neurobiology, Berlin-Heidelberg, 106–112.
- Dash P. K., Karl K. A., Colicos M. A., Prywes R., Kandel E. R., 1991. *cAMP response element-binding protein is activated by Ca^{2+} /calmodulin as well as cAMP-dependent protein kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5061–5065.
- Dragunow M., Abraham W. C., Goulding M., Mason S. E., Robertson H. A., Faull R. L. M., 1989. *Long-term potentiation and the induction of c-fos mRNA and proteins in the dentate gyrus of unanesthetized rats*. Neurosci. Lett., 101, 279–280.
- Exton J. H., 1990. *Signalling through phosphatidylcholine breakdown*. J. Biol. Chem., 265, 1–4.
- Fazell M. S., Corbet J., Dunn M. J., Dolphin A. C., Bliss T. V. P., 1993. *Changes in protein synthesis accompanying long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo*. J. Neurosci., 13, 1346–1353.
- Fisher S. K., Klinger P. D., Agranoff B. W., 1983. *Muscarinic agonist binding and phospholipid turnover in brain*. J. Biol. Chem., 258, 7358–7363.
- Garthwaite J., 1991. *Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system*. Trends Neurosci., 14, 60–67.
- Ginty D. D., Bading H., Greenberg M. E., 1992. *Trans-synaptic regulation of gene expression*. Curr. Opin. Neurobiol., 2, 312–316.
- Grant S. G. N., O'Dell T. J., Karl K. A., Stein P. L., Soriano P., Kandel E. R., 1992. *Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice*. Science, 258, 1903–1910.
- Hebb D. O., 1949. *The Organization of Behaviour*. Wiley J., New York.
- Henzi V., MacDermott A. B., 1992. *Characteristics and function of Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons*. Neuroscience, 46, 251–273.

- Hu G.-Y., Hvalby O., Walaas S. I., Albert K. A., Skjeflo P., Andersen P., Greengard P., 1987. *Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation*. Nature (London), 328, 426–429.
- Huang Y.-Y., Colley P. A., Routtenberg A., 1992. *Postsynaptic then presynaptic protein kinase C activity may be necessary for long-term potentiation*. Neuroscience, 49, 819–827.
- Kaczmarek L., 1992. *Expression of c-fos and other genes encoding transcription factors in long term potentiation*. Behav. Neural. Biol., 57, 263–266.
- Kaczmarek L., 1993. *Molecular biology of Vertebrate learning: Is c-fos a new beginning?* J. Neurosci. Res., 34, 377–381.
- Kandel E. R., O'Dell T. J., 1992. *Are adult learning mechanisms also used for development?* Science, 258, 243–245.
- Kandel E. R., Schwartz J. H., 1982. *Molecular biology of learning: modulation of transmitter release*. Science, 218, 433–443.
- Katoh T., Fujisawa H., 1991. *Autoactivation of calmodulin-dependent protein kinase II by autophosphorylation*. J. Biol. Chem., 266, 3039–3044.
- Keller B. V., Hollman M., Heinemann S., Konnerth A., 1992. *Calcium influx through subunits Glu R1/Glu R3 of kainate/AMPA receptor channels is regulated by cAMP dependent protein kinase*. EMBO J., 11, 891–896.
- Kelly R. B., 1993. *Storage and release of neurotransmitters*. Cell, 72/Neuron, 10 (Suppl.), 43–53.
- Kelly P. T., Weinberger R. P., Waxham M. N., 1988. *Active site-directed inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type II by bifunctional calmodulin-binding peptide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4991–4995.
- Konopka D., 1991. *Molekularne i komórkowe podstawy uczenia u Aplysia californica*. Post. Biol. Kom., 18, 227–240.
- Konorski J., 1948. *Conditioned Reflexes and Neuron Organization*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Lisman J. E., Goldring M. A., 1988. *Feasibility of long-term storage of graded information by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5320–5324.
- Malenka R. C., Madison D. V., Nicoll R. A., 1986. *Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters*. Nature (London), 321, 175–177.
- 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 (London), 340, 554–557.
- Malinow R., Madison D. W., Tsien R. W., 1988. *Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation*. Nature (London), 335, 820–824.
- Manzoni O. J. J., Finiels-Marlier F., Sasseti I., Blockaert J., Peuch C., Sladeczek F. A. J., 1990. *The glutamate receptor of the Q_p -type activates protein kinase C and is regulated by protein kinase C*. Neurosci. Lett., 109, 146–151.
- Means A. R., Dedman J. R., 1980. *Calmodulin: An intracellular calcium receptor*. Nature (London), 285, 73–77.
- Mileusnic R., Rose S. P. R., Tillson P., 1980. *Passive avoidance learning results in region-specific changes in concentration of and incorporation into colchicine-binding proteins in the chick forebrain*. J. Neurochem., 34, 1007–1015.
- Montarolo P. G., Goelet P., Castellucci V. F., Morgan J., Kandel E. R., 1986. *A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia*. Science, 234, 1249–1254.
- Murphy T. H., Worley P. F., Baraban J. M., 1991. *L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes*. Neuron, 7, 625–635.
- Nikolaev E., Tishmeyer W., Krug M., Matthies H., Kaczmarek L., 1991. *c-fos protooncogene expression in rat hippocampus and entorhinal cortex following tetanic stimulation of the perforant path*. Brain Res., 560, 346–349.

- Nishizuka Y., 1992. *Intracellular signalling by hydrolisis of phospholipids and activation of protein kinase C*. Science, 258, 607–614.
- O'Dell T. J., Hawkins R. D., Kandel E. R., Arancio O., 1991. *Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 11285–11289.
- O'Dell T. J., Kandel E. R., Grant S. G. N., 1991. *Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors*. Nature (London), 353, 558–560.
- Pinsker H., Kupfermann I., Castellucci V. F., Kandel E. R., 1969. *Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia*. Science, 167, 1740–1742.
- Poddana H., Barańska J., 1991. *Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach*. Post. Biochem., 37, 2–5.
- Rose S. P. R., 1991. *How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling*. Trends Neurosci., 14, 390–397.
- Routtenberg A., 1986. *Synaptic plasticity and protein kinase C*. Progr. Brain Res., 211–234.
- Silva A. J., Stevens C. F., Tonegawa S., Wang Y., 1992. *Deficient hippocampal long-term potentiation in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice*. Science, 257, 201–206.
- Simon M. I., Strathmann M. P., Gautam N., 1991. *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 252, 802–808.
- Skangiel-Kramska J., Kaczmarek L., 1992. *Co nowego w badaniach biochemii pamięci?* Problemy, 550, 35–41.
- Sweatt J. D., Kandel E. R., 1989. *Persistent and transcriptionally-dependent increase in protein phosphorylation in long-term facilitation of Aplysia sensory neurons*. Nature (London), 339, 51–54.
- Ullrich A., Schlessinger J., 1990. *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 61, 203–212.
- Wang J.-H., Feng D.-P., 1992. *Postsynaptic protein kinase C essential to induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA₁ region*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2576–2580.