

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
INFORMATIKOS FAKULTETAS  
SISTEMINĖS ANALIZĖS KATEDRA

Giedrė Slivko

## **Biologinių neuronų mokymosi savybių tyrimas**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas  
Doc. dr. Aušra Saudargienė

Kaunas  
2008

## Turinys

1. Įvadas.....	3
2. Teorinis pagrindas – sąvokos, aprašymai.....	6
2.1. Smegenys.....	6
2.2. Enzimai.....	7
2.3. Substratai.....	8
2.4. Fosforilinimas.....	8
2.5. Kinazė.....	8
2.6. Fosfatazė.....	8
2.7. Sinapsiniai receptoriai.....	8
2.8. Neurotransmiteriai.....	10
2.9. Kalcis, kalcio jonai.....	10
2.10. Kalcio srovės.....	10
2.10.1. Aukšto slenksčio kalcio srovė.....	11
2.10.2. Žemo slenksčio kalcio srovė.....	11
2.10.3. N tipo kalcio srovė.....	12
2.11. Kalmodulinas.....	12
2.12. Nuo $Ca^{2+}/CaM$ priklausanti kinazė II.....	12
2.13. Kalcineurinas.....	15
2.14. Dendritiniai spainai.....	15
2.15. Sinapsinis plastiškumas.....	16
2.16. Ilgalaikiai sinapsiniai pokyčiai.....	17
2.16.1. Ilgalaikė potenciacija.....	18
2.16.2. Ilgalaikė depresija.....	18
2.17. Atmintis – ilgalaikė, trumpalaikė.....	18
3. Fizikiniai ir matematiniai modeliai.....	20
3.1. Pirmos eilės kinetinės lygtys.....	20
3.2. Sinapsinis svoris.....	21
3.3. Stochastinis algoritmas.....	21
4. Sinapsių plastiškumo modeliai.....	24
4.1. d'Alcantara modelis.....	24
4.2. Modelio aprašas.....	25
4.3. Gauti rezultatai.....	26
4.4. Holmso modelis.....	27
4.5. Modelio aprašas.....	27
4.6. Gauti rezultatai.....	29
4.7. Modelių analizė ir palyginimas.....	30
5. Modelių tyrimai.....	32
5.1. Modelio įgyvendinimas.....	32
5.1.1. Kalcio signalo forma.....	32
5.1.2. Realūs kalcio signalai Holmso modelyje.....	34
6. Išvados.....	56
7. Naudota literatūra.....	58
8. Santrumpų žodynas.....	60
9. Priedai.....	61
9.1. Konferencijos ir apdovanojimai.....	61
9.2. Konferencijų medžiaga.....	61

## 1. Įvadas

Atmintis – viena įdomiausių gyvūnų – stuburinių ir bestuburių – savybių. Visą, ką mes darome, savyje akumuliuoja ir perdirba smegenys. Nuo pat vystymosi smegenys kaupia informaciją, ją apdoroja ir paverčia į trumpalaikę arba ilgalaikę atmintį. Smegenys gali skaičiuoti. Argi tai nėra keista? Tokios žmogiškos savybės kaip meilė, neapykanta ir kitos yra paprasčiausiai smegenų matematika. Žinoma, kad ir kokia paprasta iš pirmo žvilgsnio atrodytų ši matematika, jos išnagrinėti iki galo nepavyko dar niekam. Dažniausiai smegenų apibūdinimas atitinka to meto pažangiausių technologijų apibūdinimus. Renesanso metu, smegenys buvo lyginamos su fontanų hidraulinėmis sistemomis. Tarpukario metu mokslininkai pradėjo smegenis lyginti su telefono komutatoriumi. Paskutiniaisiais dešimtmečiais smegenys yra lyginamos su šių dienų stebuklu – skaitmeniniu kompiuteriu (Koch, 1999).

Nesvarbu su kuo mes lygintume smegenis, aiški schema – kokie procesai vyksta ir kaip jie apdorojami – nėra suprata. Ilgi evoliucijos metai paskui save paliko ilgą pėdsaką įvairiausių užuominų. Pirmas didelis žingsnis mįslės įminimo link yra žengtas – sudaryti įvairių gyvųjų organizmų genetiniai medžiai. Taip pat yra žinomi kai kurie procesai vykstantys smegenyse bei elementai, kurie dalyvauja tuose procesuose. Visgi, daugelis dedamųjų yra tiesiog stacionarūs kintamieji, pritaikomi atskiram procesui. Žinoma koks turi būti rezultatas, dėl to modeliuojamų procesų „spragos“ užpildomos tam tikrais kintamaisiais. Tačiau reikia nepamiršti, jog vienas iš svarbesnių atradimų, susijusių su veikimo potencialų generavimu, buvo padarytas būtent tokiu būdu – du mokslininkai, Hodžkinas ir Haksli (Hodgkin ir Huxley), 1952 pateikė savo hipotezes apie veikimo potencialo sukėlimą ląstelėje. Daugelis jų padarytų išvadų pasitvirtino atsiradus platesnėms galimybėms ištirti elektrines nervinės ląstelės savybes.

Didžiausias problema mokslininkams kol kas kelia nervinių ląstelių dydžiai. Žmogaus smegenis sudaro apie 100 milijardų neuronų, kurių kiekvienas jungiasi bent su 10 000 kitų neuronų (palyginimui, Intel Pentium 4 mikroprocesoriuje yra 55 milijonai tranzistorių). Atsižvelgiant į tokį kiekį ląstelių, procesai, vykstantys, smegenyse yra palyginti greitai, toli sklindantys. Dėl to jų sekimas yra gana kompliktuotas veiksmas.

Viena iš labiausiai paplitusių smegenų tyrinėjimo sferų yra atmintis. Yra manoma, jog atmintis yra saugoma sinapsėse – jungtyse tarp neuronų. Sinapsės turi vieną labai svarbią savybę – jų pagalba galima atkurti signalų eigą, kuri joms buvo pateikta prieš tam tikrą laiko tarpą. Taip pat sinapsės turi savo svorį (tai daugiau filosofinis nei fizinis apibūdinimas), kurį gali keisti nustatytu laiko tarpu. Sinapsės gebėjimas keisti savo svorį vadinamas sinapsiniu

plastiškumu. Sinapsės taip pat gali augti ir išnykti. Manoma, jog kuo daugiau sinapsių (susijungimų tarp neuronų), tuo geresnė žmogaus atmintis.

Taigi, neuronai vienas su kitu susisiečia siųsdami veikimo potencialus, kurie perduodami per sinapses. Veikimo potencialo perdavimas įvyksta per labai sudėtingų procesų virtinę. Šiuos procesus reguliuoja nemažai kitų biofizikinių procesų. Vienas svarbiausių vyksmų yra kalcio jonų ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tekėjimas sinapsiniame terminale. Be šio elemento tekėjimo ląstelėse negalėtų vykti jokie procesai – jos tiesiog žūtų nuo kalcio trūkumo. Tačiau ir kalcio perteklius gali būti ląstelių žūties priežastimi. Teigiama, jog  $\text{Ca}^{2+}$  jonai reguliuoja daugelio fermentų aktyvumą ir taip dalyvauja kuriant sinapsinį plastiškumą, formuojant atmintį, taip pat neuro moduliacijoje – pakeičiant membranos elektrines savybes (Svirskis, 2007).

Nors atminties „buvimas“ smegenyse vis dar miglotas procesas, galima teigti, jog kai kurios svarbios sudedamosios šio proceso dalys yra aiškios – atmintis saugoma sinapsėse, jose vykstančius procesus reguliuoja kalcio jonų tekėjimas.

Šiame biologinių neuronų mokymosi savybių tyrime yra nagrinėjami d'Alcantaros (d'Alcantara ir kt., 2003) bei Holms'o (Holmes, 2000) kinetiniai modeliai, kuriuose yra tiriama kalcio jonų įtaka sinapsiniam plastiškumui. Šiuose modeliuose nagrinėjamos skirtingos kalcio jonų sukeltų procesų grandinės. Tačiau šie skirtingi modeliai patvirtina vieną svarbią hipotezę – greitas, didelės amplitudės viduląstelinio kalcio koncentracijos pakilimas lemia (neuro) ilgalaikę potenciaciją (angl. long-term potentiation), o mažesnis ir ilgiau užsitęsęs signalas lemia ilgalaikę depresiją (angl. long-term depression). Šie du modeliai buvo kuriami naudojant dirbtinius kalcio signalus. Tuo tarpu šiame tyrime buvo pasitelkti į pagalbą realūs kalcio signalai, sugeneruoti Poirazi (Poirazi ir kt., 2003) pateiktu hipokampo CA1 piramidinio neuro modeliu.

Sinapsiniame plastiškume pateikiama svarbi veikimo potencialų poravimo laikų hipotezė – jeigu presinapsinis veikimo potencialas lenkia postsinapsinį veikimo potencialą, yra stebima ilgalaikė potenciacija; jeigu postsinapsinis veikimo potencialas lenkia presinapsinį veikimo potencialą, stebima ilgalaikė depresija. Tačiau pastaruoju metu yra pastebima, kad ne tik laikinė, bet ir erdvinė neuro padėtis turi didelės įtakos sinapsių svorio keitimui. Neuro elektrinės savybės – veikimo potencialų generavimas ir perdavimas – užima svarbią vietą sinapsiniame plastiškume. Bi ir Rubin (Bi ir Rubin, 2005) siūlo, jog kalcio jonų prisijungimo prie nuo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM priklausomos kinazės II (angl. calcium/calmodulin-dependent kinase II, CaMKII) bei kalcineurino (CaN) laikinės charakteristikos bei buvimo vieta postsinapsinėje pusėje gali būti lemiami veiksniai potenciacijos ir depresijos moduliams, kurie vyksta nuo laiko priklausomu būdu, norint

nustatyti plastiškumo rezultata. Letzkus (Letzkus ir kt., 2006) antrina, jog sinapsės veikia remdamosi daugiau lokalinėmis nei globalinėmis mokymosi taisyklėmis.

Šiame tiriamajame modelyje atliekami eksperimentai tiek su sinapsėmis, esančiomis prie somos, tiek su sinapsėmis, esančiomis dendritiniame medyje. Bandymai atliekami poruojant postsinaptinius veikimo potencialus su presinaptiniais veikimo potencialais. Laikas tarp šių įvykių kinta nuo -50ms (postsinapsinis veikimo potencialas lenkia presinapsinį nurodytu laiko tarpu) iki 50ms (presinapsinis veikimo potencialas lenkia postsinapsinį nurodytu laiko tarpu). Norima išsiaiškinti, ar artimosios ir tolimosios sinapsės duoda tą patį atsaką į jose sukeltą žadinimą. Kitaip tariant, norima iširti sinapsinio plastiškumo savybių priklausomybę nuo sinapsės vietos dendritiniame medyje.

Nemažai įtakos postsinapsinėje pusėje turi kinazė CaMKII. Dėl turimų savybių ši kinazė atlieka svarbų vaidmenį ilgalaikėje potenciacijoje. Tyrime taip pat nagrinėjama ir šios kinazės aktyvavimo eiga, kuri stipriai priklauso nuo  $Ca^{2+}$  koncentracijos kitimo ląstelėje.

Antrajame skyriuje bus aprašomos pagrindinės sąvokos, naudojamos tyrime. Kadangi aprašomoje srityje daugiausiai naudojamos molekulinės biologijos sąvokos, skaitytojui pravartu susipažinti su šiame skyriuje pateiktais aprašymais.

Trečiajame skyriuje aprašomi matematiniai ir fizikiniai modeliai, kuriais remiantis yra sudaromi tiriamieji neuronų mokymosi modeliai.

Ketvirtajame skyriuje pateikia naudojamų d'Alcantaros ir Holmsio modelių detalūs aprašai ir analizė.

Penktajame skyriuje aprašomas atliktas tyrimas, naudojantis sukurtais modeliais. Remiantis gautais rezultatais padaromos išvados, kurios pateikiamos šeštajame skyriuje.

Devintajame skyriuje pateikiamas sąrašas konferencijų, kuriose buvo ar bus dalyvaujama. Taip pat kalbama apie premiją, kurią skyrė magistrinių darbų paramai įsteigta bendrovės „Philip Morris Baltic“ programa Laurus.

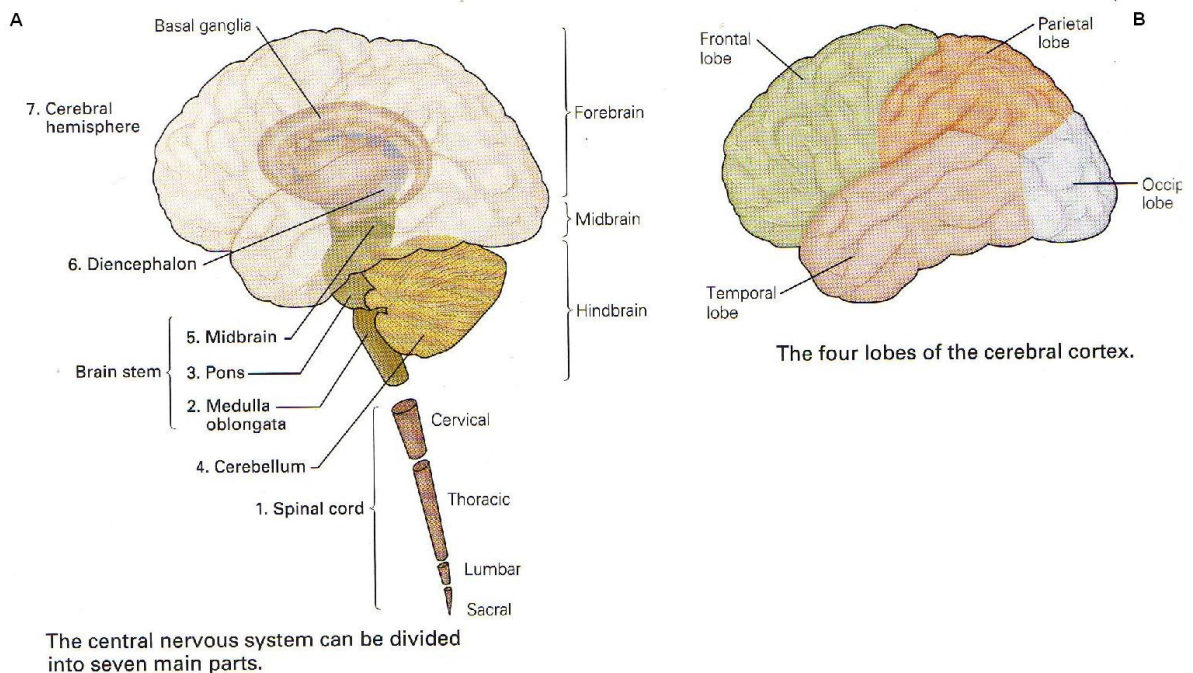
## 2. Teorinis pagrindas – sąvokos, aprašymai

Šiame skyriuje pateiktos pagrindinės sąvokos, susijusios su procesais, vykstančiais smegenyse. Tai tik tos dalys, kurios yra naudojamos tiriamuose Holmso ir d'Alcantaros modeliuose. Kadangi nagrinėjami tik mokymosi procesai, nemaža dalis kitų procesų yra tiesiog neminimi šiame tyrime.

### 2.1. Smegenys

Kandel ir kt. (Kandel ir kt., 2000) savo knygoje bando apjungti dvi skirtingas mokslo sritis – elgseną, mokslą apie protą, bei nervų sistemos mokslą, mokslą apie smegenis. Tokį platų pasirinkimą jie aiškina tuo, jog visi veiksmai yra nulemti smegenų veiklos. Tai, ką mes dažniausiai vadiname protu, yra operacijų seka, įvykdyta smegenų.

Smegenų sandara pavaizduota 1-A pav. Smegenis sudaro septynios pagrindinės dalys: 1) stuburo smegenys; 2) pailgosios smegenys; 3) tiltas; 4) smegenėlės; 5) vidurinės smegenys; 6) tarpinės smegenys, bei 7) galinės smegenys arba didieji pusrutuliai.



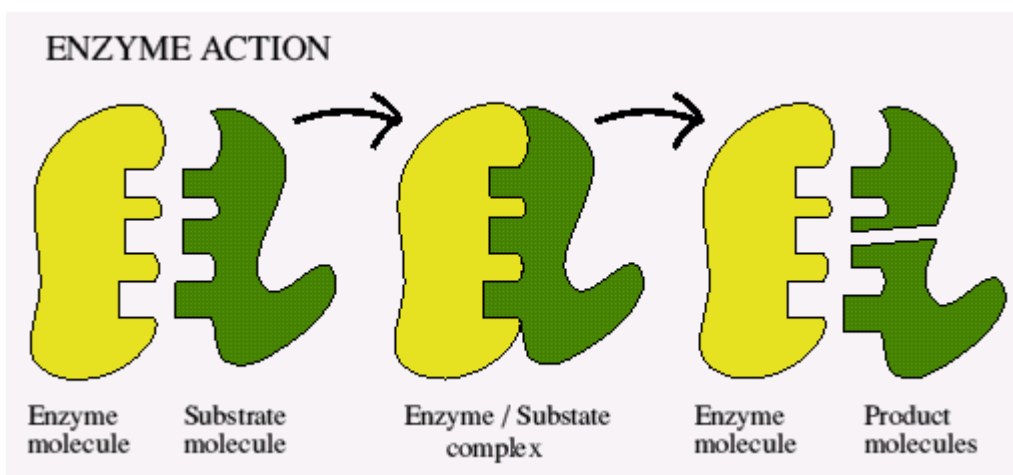
**1 pav.** Žmogaus smegenys. **A** Smegenų sandara. **B** Didžiųjų pusrutulių keturios sritys. Paimta iš Kandel ir kt., 2000.

Visos pažinimo funkcijos lokalizuojasi didžiųjų pusrutulių išoriniame sluoksnyje – smegenų žievėje. Didieji pusrutuliai taip pat turi dažnai neuromokslininkų tiriama sritį hipokampą (Amono ragą). Didieji pusrutuliai skirstomi į keturias anatomiškai atskiras skiltis: kaktinę (angl. frontal), parietalinę (esančią prie sienelių) (angl. parietal), smilkininę (angl. temporal) bei pakaušinę (angl. occipital) (1-B pav.). Kiekviena šių skilčių turi specializuotas funkcijas. Priekinė skiltis labiausiai susijusi su ateities veiksnių planavimu ir su judesių

valdymu; parietalinė skiltis susijusi su kūno jutimais, kūno vaizdo formavimu; smilkininė skiltis susijusi su regėjimu; pakaušinė sritis – su klausa. Giliau esantys hipokampus ir migdolinis kūnas (angl. amygdala) susiję su mokymusi, atmintimi bei emocijomis.

## 2.2. Enzimai

Enzimai (fermentai) – yra biomolekulės, kurios katalizuoja (t.y. padidina vyksmo greitį) chemines reakcijas. Praktiškai visi enzimai yra baltymai. Enziminėse reakcijose, substratais vadinamos pradinių medžiagų molekulės, o enzimai paverčia jas į skirtingas molekules – produktus (2 pav.). Beveik visiems procesams biologinėse ląstelėse reikalingi enzimai, norint sukelti reikšmingas chemines reakcijas. Kadangi enzimai yra nepaprastai išrankūs savo substratams ir greitina tik kelias reakcijas iš daugelio galimų, kompleksas enzymų, sudarytų ląstelėje, nustato, kurie medžiagų apykaitos keliai įvyksta toje ląstelėje.



**2 pav.** Enziminė reakcija. Enzimo molekulė susijungia su substrato molekule. Enzimas dalyvauja reakcijoje pakeičiant substratą į galutinius produktus ir juos paleidžia.

Kaip ir visi katalizatoriai, enzimai dirba sumažindami aktyvacijos energiją, reikalingą reakcijai, tokiu būdu ryškiai padidindami reakcijos vykimo greitį. Daugumos enziminių reakcijų greičiai yra milijonus kartų didesni palyginti su nekatalizuotomis reakcijomis. Kaip su visais katalizatoriais, enzimai nėra sunaikinami reakcijų, kurias jie katalizuoja, metu bei jie nekeičia šių reakcijų pusiausvyros. Tačiau enzimai tikrai skiriasi nuo didžiosios dalies kitų katalizatorių, būdami labiau specifiniai. Žinoma, kad enzimai katalizuoja apytiksliai 4 000 biocheminių reakcijų.

Enzimo veikla gali būti paveikta kitų molekulių. Inhibitoriai yra molekulės, kurios sumažina enzimo aktyvumą; aktyvatoriai yra molekulės, kurios padidina aktyvumą. Daug vaistų ir nuodų yra enzymų inhibitoriai. Aktyvumas taip pat yra veikiamas temperatūros, cheminės aplinkos (pavyzdžiui pH) ir substrato koncentracijos.

### 2.3. Substratai

Biochemijoje substratai yra molekulės, kurias veikia enzimai. Enzimai katalizuoja šias biochemines reakcijas. Substratas prisijungia prie enzimo aktyviosios pusės, taip suformuodamas enzimo-substrato kompleksą. Vėliau substratas skyla į produktą ir yra paleidžiamas nuo aktyviosios pusės (2 pav.). Aktyvioji enzimo pusė tampa laisva ir gali priimti kitą substrato molekulę. Formulė, aprašanti tokią reakciją:



čia E – enzimas, S – substratas, P – produktas. Atkreipkite dėmesį, jog tik vidurinis žingsnis yra negrįžtamas.

Didinant substrato koncentraciją, reakcijos greitis didės dėl tikimybės, kad padidės enzimo-substrato kompleksų skaičius; tai vyksta tol, kol enzimas netampa ribojimo faktoriumi.

### 2.4. Fosforilinimas

Fosforilinimas – yra fosfato (PO<sub>4</sub>) grupės prisijungimas prie baltymo molekulės arba prie kitos nedidelės molekulės. Grįžtamasis baltymų fosforilinimas yra svarbus reguliavimo mechanizmas, kuris vyksta ir prokariotų, ir eukariotų organizmuose. Enzimai, vadinami kinazėmis (fosforilinimas) ir fosfatazėmis (defosforilinimas), yra įtraukti į šį procesą. Daug enzymų ir receptorių yra įjungiami ar išjungiami fosforilinimo ir defosforilinimo būdu. Grįžtamojo fosforilinimo baigtis yra konformacinis<sup>1</sup> daugelio enzymų ir receptorių struktūros pasikeitimas. Tai priverčia juos tapti aktyvuotais ar deaktyvuotais.

### 2.5. Kinazė

Kinazė – tai enzimo tipas, kuris perveda fosfato grupes iš aukštos energijos donorų molekulių, tokių kaip ATP<sup>2</sup>, į specifines tikslo molekules (substratus); procesas vadinamas fosforilinimu.

### 2.6. Fosfatazė

Fosfatazė yra enzimas, kuris pašalina fosfato grupę nuo jos substrato. Šis veiksmas yra priešingas kinazių atliekamam veiksmui, kurio metu yra pridama fosfato grupė prie jų substratų, naudojant aktyvias molekules, tokias kaip ATP.

### 2.7. Sinapsiniai receptoriai

Postsinapsiniai receptoriai būna dviejų rūšių (3 pav.). Jonotropiniai receptoriai (3-A pav.) suporuoti su joniniu kanalu, kuris atsidaro ir leidžia tam tikro tipo jonams kirsti

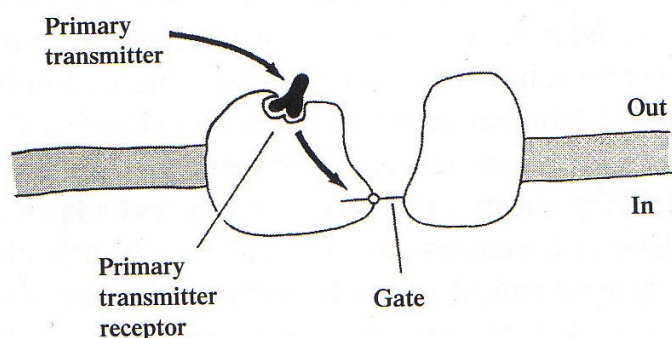
<sup>1</sup> Konformacija – molekulės momentinis erdvinis pavidalas, priklausantis nuo atomų (grupių) sukimosi apie juos jungiančius cheminius ryšius.

<sup>2</sup> ATP – Adenozin 5' trifosfatas – vienas pagrindinių ląstelės makroenergetinių junginių.

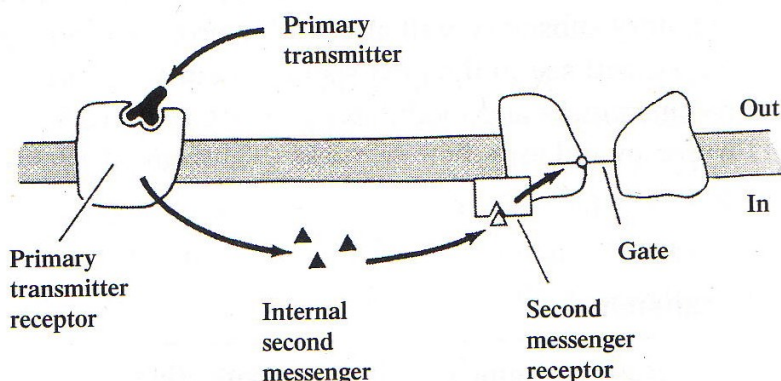


postsinapsinę membraną. Turėdami artimą tašką į tašką jungtį tarp presinapsinės išleidimo zonos ir postsinapsinio receptoriaus ir tiesioginį receptoriaus ir joninio kanalo poravimą, jonotropinių receptorių veikimas yra greitas ir trumpalaikis. Pagrindiniai tokių receptorių tipai yra keturi: GABA<sub>A</sub> ( $\alpha$ -aminobutyric acid, GABA), GABA<sub>B</sub>, NMDA (N-methyl-D-aspartate acid, NMDA) ir ne-NMDA. Verta pažymėti, jog NMDA receptoriai yra priklausomi nuo įtampos. Jonotropiniai receptoriai įgyvendina skaičiavimus, reikalingus greitam suvokimui ir judesių kontrolei.

### A) Channel Using Intrinsic Sensor



### B) Channel Using Remote Sensor



**3 pav. A** Greitas žadinamasis ir/ar slopinantis signalas valdomas glaudžiai susijusiu jonotropiniu receptorių-kanalų kompleksu. Neurotransmiterio prisijungimas sukelia greitą joninio kanalo atsidarymą. **B** Metabotropiniame receptoriuje prisijungus neurotransmiteriui yra aktyvuojama antrinių pranešėjų medžiaga. Šios molekulės, greičiausiai, po difundavimo į veikimo vietą, prisijungia prie tam tikro joninio kanalo ir keičia jo savybes. Paimta iš Koch, 1999.

Metabotropiniai receptoriai (3-B pav.) skiriasi tuo, kad susijungę su neurotransmitteriu jie iš pradžių aktyvuoja kai kurias viduląstelines molekules, vadinamas antriniais pranešėjais (angl. second messenger), kurios savo ruožtu gali sukelti konformacinius pakitimus kai kuriuose jonų kanaluose, taigi ir jų kinetinėje elgsenoje. Populiariausi iš antrinių pranešėjų yra kalcio Ca<sup>2+</sup> jonai.

Svarbus skirtumas tarp jonotropinių ir metabotropinių receptorių yra jų laiko skalė. Jeigu jonotropinių receptorių klasė veikia sparčiai, kelių sekundės dalelių intervale, tai

metabotropinės klasės receptorių riboja difuzija. Biocheminės reakcijos gali vykti akimirksniu lyginant neuronų laiko skalėje. Tačiau jeigu sinapsinis indėlis metabotropiniam receptoriui sukelia kelių antrinių pranešėjų paleidimą, kurie turi difunduoti į ląstelės kūną tam, kad „atliktų savo darbą“, laiko skalė gali išsitempti iki sekundžių ar net ilgiau.

## 2.8. Neurotransmiteriai

Neurotransmiteriai – yra cheminiai preparatai, kurie yra panaudojami signalo perdavimui, stiprinimui ir moduliacijai<sup>3</sup> tarp neurono ir kitos ląstelės. Šios medžiagos koncentraciją galime laikyti globalaus kintamojo smegenyse ekvivalentu. Kompiuterio programoje globalūs kintamieji apibrėžiami visai programai, o ne vienai tam tikrai procedūrai, taip ir ilgo veikimo neuromoduliacinių medžiagų išlaisvinimas paveiks visus neuronus, esančius tam tikroje zonoje nuo neurotransmiterių paleidimo vietos.

## 2.9. Kalcis, kalcio jonai

Veikimo potencialų generavimo mechanizmas buvo išaiškintas Hodžkino ir Haksli. Jie teigė, jog šį mechanizmą valdo dvi pagrindinės srovės – natrio (N) jonų srovė ir kalio (K) jonų srovė. Jos veikia viena nuo kitos nepriklausomai; natrio srovė yra nukreipta į ląstelės vidų, o kalio srovė, prasidedanti vėliau už natrio srovę, yra nukreipta į ląstelės išorę. Norint iki galo suprasti membranos potencialo dinamiką, reikia taip pat paminėti ir kalcį. Jonizuotas kalcis ( $Ca^{2+}$ ) yra dažniausiai pasitaikantis signalų transdukcijos<sup>4</sup> elementas biologijoje.  $Ca^{2+}$  vaidmuo sinapsinio paleidimo sukėlime, kai į sinapsę atsklinda veikimo potencialas, yra pagrindinis faktorius aksonų augimui ir raumenų susitraukimams.  $Ca^{2+}$  signalas yra lemiamas sinapsinio plastiškumo sukėlime. Dėl to apie kalcį yra sakoma, jog tai yra tarpininkas, kuris suveda skaičiavimus (greitus ir labai lokalizuotus membranos pasikeitimus per laiką) į veiksmą. Jeigu neuronas nusprendžia ką nors daryti,  $Ca^{2+}$  yra viso veiksmo raktas.

Viduląstelinio kalcio jonų šaltiniai yra du. Pirmasis tai būtų  $Ca^{2+}$  įtekėjimas į viduląstelinę citoplazmą, reguliuojamas nuo įtampos priklausančių kalcio kanalų bei NMDA sinapsinių receptorių kompleksu, esančiu ląstelės membranoje. Kitas šaltinis yra endoplazminis tinklas. Šios organelės yra išsidėstę per visą neuroną ir yra laikomos kalcio jonų saugyklomis.

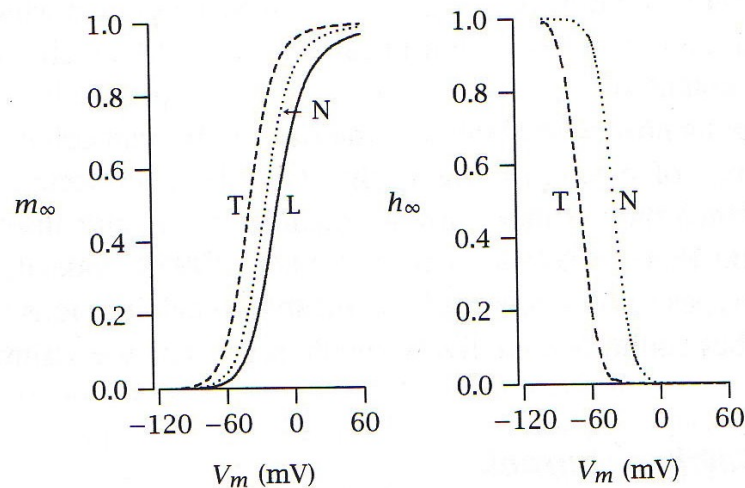
## 2.10. Kalcio srovės

Aptarkime pagrindines kalcio jonų srovių savybes. Svarbiausias faktas yra tas, kad jungtinė kalcio srovė yra visada aktyvuojama depolarizacijos, visą laiką nukreipta į vidų ir

<sup>3</sup> Moduliacija – tolygiai ir taisyklingai vykstančio proceso parametrų keitimas pagal tam tikrą dėsnį (tokiu būdu perduodama informacija).

<sup>4</sup> Transdukcija – signalo virsmas iš vienos rūšies į kitą.

turi šioki tokį neveiklumo (angl. inactivation) lygį. Labiausiai skirtingi dalykai tarp pačių kalcio srovių yra jų jautrumas depoliarizacijai. Kai kurios srovės aktyvuojasi kelių milivoltų depoliarizacijos atsake, tuo tarpu kitoms prireikia 20 mV ar net daugiau. Dar vienas labai svarbus faktas yra tas, jog kalcio srovių „ieškoti“ nereikia. Jos yra visuose neuronuose, bei visose neuronų dalyse – daugiausia jos teka aksonais, bet jos fiksuojamos ir dendritiniame medyje, ląstelės kūne ar presinapsinėse zonose. Kol kas yra išskiriamos trys kalcio srovių rūšys.



4 pav. Kalcio srovių aktyvacijos ir neveiklumo ribos. Kairėje parodyta kalcio srovių aktyvacija, dešinėje – neveiklumas kaip funkcijos nuo membranos įtampos  $V_m$  trims kalcio srovėms (detaliau tekste). Paimta iš Koch, 1999.

### 2.10.1. Aukšto slenksčio kalcio srovė

Ši srovė, žymima L dėl savo ilgos (angl. long) trukmės, ilgus metus buvo vienintelė žinoma kalcio srovė. L srovė yra aktyvuojama beveik pačiame depoliarizacijos pike (ląstelės membranos ramybės potencialas yra  $\sim -70$  mV, veikimo potencialas depoliarizuoja jį iki  $\sim 40$  mV). Jos pusės aktyvacijos taškas (angl. halfway activation point) yra apie 0-10 mV (4 pav.). Tai reiškia, kad prie membranos ramybės potencialo ši srovė yra visiškai deaktyvuota. Šios srovės neveiklumas priklauso ne nuo membranos potencialo, bet nuo kalcio koncentracijos tiesiai po membrana. Pusės neveiklumo taškas yra ties mažu kalcio jonų koncentracijos lygiu (dešimčių mikromolių). Taip pat ši srovė nereaguoja akimirksniu į depoliarizaciją, bet pasirodo su šiokiu tokiu vėlinimu.

### 2.10.2. Žemo slenksčio kalcio srovė

Ši kalcio srovė, žymima T, yra aktyvuojama gerokai žemesniu įtampos lygiu nei L srovė. Dažniausiai šios srovės pusės aktyvumo taškas yra apie -40 mV (4 pav.). Ramybės metu srovė yra išjungta. Neveiklumas yra lėtas vyksmas, tačiau visiškai priklausomas nuo įtampos. Fiziologinėmis sąlygomis, T srovė gali būti sukelta hiperpoliarizavus membranos

potencialą (toku būdu panaikinant neveiklumą) ir tuo pačiu leidžiant sinapsinį įėjimo signalą (kitai tarus, depoliarizuojant ląstelę).

### **2.10.3.N tipo kalcio srovė**

Tai yra srovė, kurios savybės telpa tarp L ir T srovių savybių. Dėl to ji vadinama N – nei L, nei T. Šios srovės aktyvacija yra vidutinė tarp žemo lygio ir aukšto įtampos slenksčių srovių. Jos neveiklumas yra kiek lėtesnis nei T srovės ir yra priklausomas nuo įtampos dinamikos.

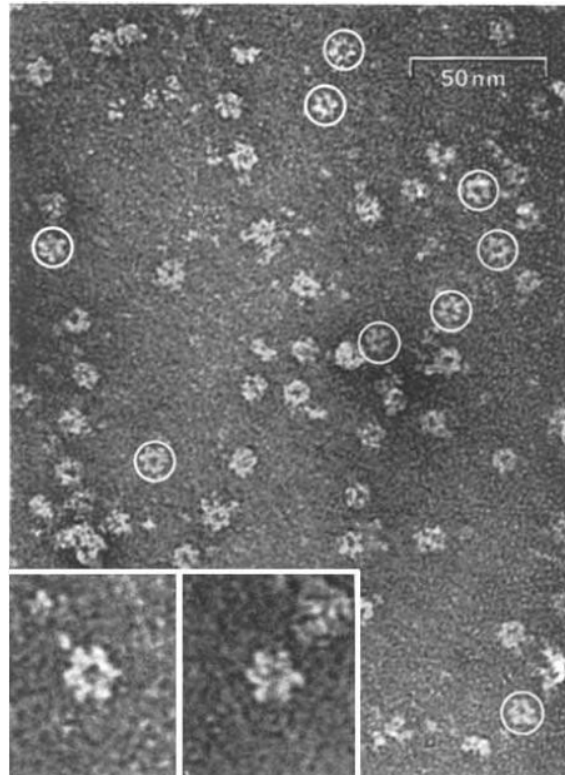
### **2.11. Kalmodulinas**

Kalmodulinas, CaM (sutrumpinimas nuo CALcium MODULated proteIN) – yra kalcį prisijungiantis baltymas, esantis visose eukariotų ląstelėse. Jis gali prisirišti prie ir reguliuoti daug skirtingų tikslinių molekulių/baltymų, tokiu būdu paveikiant daug skirtingų ląstelinių funkcijų. CaM tarpininkauja tokiuose procesuose, kaip uždegimas, medžiagų apykaita, raumens susitraukinėjimas, viduląstelinis judėjimas, trumpalaikė ir ilgalaikė atmintis, nervo vystymasis ir imuniteto atsakas. CaM yra daugelyje ląstelių tipų ir gali būti skirtingose subląstelinėse vietose, įskaitant citoplazmą, organelių vidų, susijungęs su plazma ar organelių membranomis. Daugelis baltymų, prie kurių prisijungia CaM, negali prisijungti kalcio savarankiškai, ir dėl to CaM naudojamas kaip kalcio daviklis ir signalo keitiklis. Kalmodulinas patiria konformacinį pakeitimą prisijungdamas kalcį, kuris įgalina jį jungtis prie specifinių baltymų specifiniam atsakui. CaM gali prisijungti iki keturių kalcio jonų (tokį kompleksą žymėsime  $\text{CaM}\text{Ca}_4$ ), ir gali patirti pakeičiamuosius vyksmus, tokius kaip fosforilinimą, acetilinimą ir denatūravimą, kurių kiekvienas gali potencialiai moduluoti savo veiksmus.

### **2.12. Nuo $\text{Ca}^{2+}$ /CaM priklausanti kinazė II**

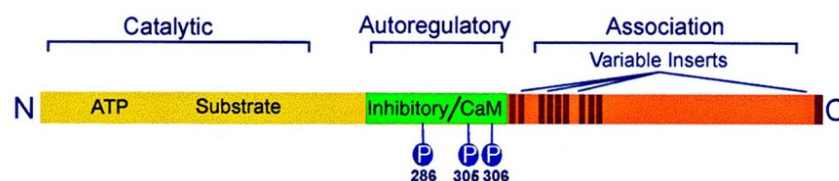
Nuo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM priklausanti kinazė II, CaMKII ( $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II) – daug kur ląstelėje esantis kalcio signalų perdavimo tarpininkas, kuris fosforilina nemažą kiekį substratų, taip koordinuodamas ir valdydamas kalcio jonų sukeltus pakeitimus ląstelės funkcijose. Šios kinazės informacijos pernešimas ir viduląstelinio kalcio jonų pakilimas nėra pasyvūs dalykai. Tiksliau, CaMKII multimerinė struktūra (5 pav.) ir autoreguliacinė savybė leidžia šiam enzymui aktyviai dalyvauti savo veiklos jautrumo, laiko ir vietos nustatymui. CaMKII gali:

- a) būti aktyvuota  $\text{Ca}^{2+}$  nuo veikimo potencialų dažnio priklausomu būdu;
- b) tapti nepriklausomu nuo savo pradinių  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM aktyvatorių;
- c) patirti molekulinio „jungiklio“ elgseną, kuri yra lemiamą kai kurioms mokymosi ir atminties formoms.



**5 pav.** Heksamerinė CaMKII struktūra. Tipinė elektroninė mikrografija. Pavaizduota nuo kalmodulino priklausanti glikogeno sintazės kinazė. Išdidinta 396000 kartų. Apibrauktos heksamerinės struktūros. Mažose nuotraukose pateikti du atskiri heksamerai, padidinti 792000 kartų. Paimta iš Woodgett ir kt. 1983.

Kalcio jonų koncentracijos padidėjimas funkcionuoja kaip pagrindinis antrinis pranešėjas, kadangi viduląstelinė  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija gali būti suvaldoma labai mažame lygyje ir tik tam, kad vėliau būtų galima staigiai reaguoti į tam tikrą  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizuojantį stimulą. Membranoje esančios pompos ir kalcio jonus prisijungiantys baltymai greitai sušvelnina (angl. buffer) viduląstelinio  $\text{Ca}^{2+}$  padidėjimą, taip sudarydami sąlygas diskrečiai erdvinei savo efektorių<sup>5</sup> ir jų tikslių molekulių kontrolei. Laikinė  $\text{Ca}^{2+}$  pernešimų dažnio informacija taip pat gali pranešti apie tam tikrus ląstelinius atsakus į  $\text{Ca}^{2+}$  signalą.



**6 pav.** Linijinė prototipinio CaMKII subvieneto diagrama. Skiriamos trys dalys: katalitinė, kuri yra autonomiškai slopinama, tačiau prisijungus  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  slopinimas yra naikinamas; autoreguliacinė sritis skirta autofosforilinimui (mažieji skaičiai reiškia serino ir treonino atmainas); asociacijos sritis sudaro grynąją šio enzimo formą. Paimta iš Hudmon ir Schulman, 2002.

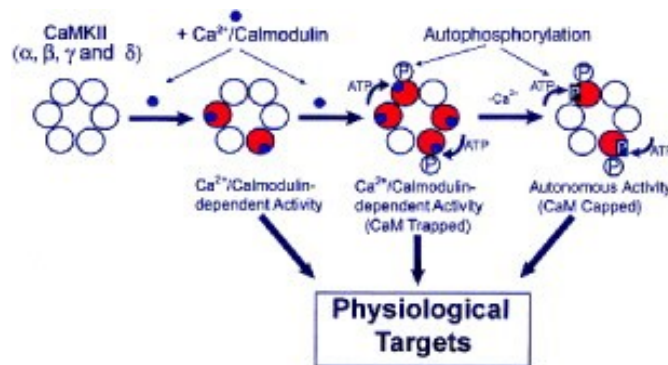
CaMKII transliuoja<sup>6</sup> ir koordinuoja dinaminio antrinio pranešėjo ( $\text{Ca}^{2+}$ ) veiksmus į tam tikrus ląstelinius atsakus fosforilinimo pagalba. Ši kinazė, kuri su kalciumu yra siejama per

<sup>5</sup> Efektorius – organas arba ląstelė, kuri neša atsaką nervinei ląstelei.

<sup>6</sup> Transliacija – antrasis baltymų sintezės etapas.

Ca<sup>2+</sup> receptorių CaM, turi autoreguliacines būsenas (6 pav.), kuri draudžia arba slopina enziminį aktyvumą kai nėra Ca<sup>2+</sup>/CaM kompleksų. Šio komplekso prisijungimas sukelia didžiausią CaMKII aktyvumą. CaMKII turi keturias aktyvias būsenas:

- 1) susijungusi CaMKII (angl. bound) – tai yra pirmoji aktyvi CaMKII būsena, kurios metu kinazė prisijungia CaM<sub>Ca4</sub> kompleksą. Ši būsena tiesiogiai priklauso nuo kalcio jonų veikimo dažnio;
- 2) kaupiančioji CaMKII (angl. trapped) – šioje būsenoje vyksta autofosforilinimas (tai reiškia, kad nebūtina išorinė energija tam, kad vyktų fosforilinimas), kurio metu CaMKII kinazei tūkstančius kartų padidėja aktyvatoriaus Ca<sup>2+</sup>/CaM trauka. Šiuo metu CaMKII išlieka itin aktyvi. Dėl to manoma, jog tai yra viena svarbesnių aktyvumo būsenų. Iš jos CaMKII gali grįžti į susijungusią arba pereiti į autonominę būsenas;
- 3) autonominė CaMKII (angl. autonomous) – šioje būsenoje CaMKII netenka CaM<sub>Ca4</sub> komplekso, tačiau išlaiko savo enziminį aktyvumą. Ši būsena vėliau nėra veikiamas CaM<sub>Ca4</sub> kompleksų. Iš šios būsenos CaMKII gali grįžti į pradinę neaktyvią būseną arba, jeigu pavyksta prisijungti CaM<sub>Ca4</sub>, gali grįžti į kaupiančiąją būseną;
- 4) užbaigiamoji CaMKII (angl. capped) – jeigu autofosforilinimas vyksta toje srityje, kurioje yra prisijungęs CaM, ir dėl to jis palieka kinazę, tai vėl prisijungti CaM tampa neįmanoma. Ciklas kartojasi iš naujo.



**7 pav.** CaMKII patiria kelias autoreguliacines būsenas. Raudonai pažymėti aktyvuoti katalitiniai subvienetai. Autofosforilinimas atlieka CaMKII funkcinius pakeitimus, kurie gali sąlygoti tolimesnius aktyvumą, reguliaciją ir funkcionavimą. Paimta iš Hudmon ir Schulman, 2002.

Toks CaMKII būdas (turėti skirtingas aktyvias būsenas) leidžia šiai kinazei veikti kalcio spaikavimo detektoriumi ir elgtis lyg molekuliniam jungikliui mokymesi ir atminties formavime kaip sinapsinio aktyvumo skaitytuvui.

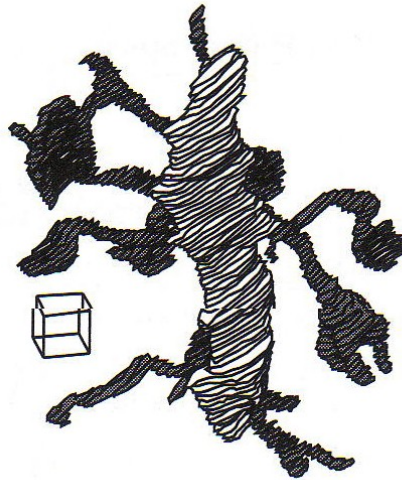


## 2.13. Kalcineurinas

Kalcineurinas, CaN – yra fosfatazė, kuri defosforilina serino ir treonino (dvi iš amino rūgščių) liekanas, esančias proteinuose. Jis susideda iš dviejų subvienetų – kalcineurino A bei kalcineurino B, kurie yra neišskiriami, tačiau skyla, jei proteinas yra denatūruojamas. Kalcineurinas A jungiasi vieną  $\text{CaM}\text{Ca}_4$ , o kalcineurinas B jungiasi iki keturių kalcio jonų; turi keturias kalcio prisijungimo dalis, panašias į CaM analogiškas dalis. Dėl to kalcineurinas gali būti aktyvuojamas dviem būdais – dalinai prisijungdamas  $\text{CaM}\text{Ca}_4$ , dalinai prisijungdamas  $\text{Ca}^{2+}$  prie B subvieneto.

## 2.14. Dendritiniai spainai

Dendritiniai spainai (8 pav.) – mažičiai, specializuoti protoplazminiai<sup>7</sup> gumbeliai, kurie dengia daugelio neuronų paviršius. Spainai yra labiausiai intriguojanti neuronų morfologinė savybė. Pagal spainus netgi yra klasifikuojami neuronai – į dygliuotus (angl. spiny) ir lygius (angl. smooth). Virš 90% visų žadinančiųjų sinapsių, kurios yra smegenų žievėje, atsiranda ant spainų. Dėl šio glaudaus ryšio spainai yra laikomi vienais iš svarbesnių sudedamųjų sinapsinio perdavimo ir plastiškumo dalių.

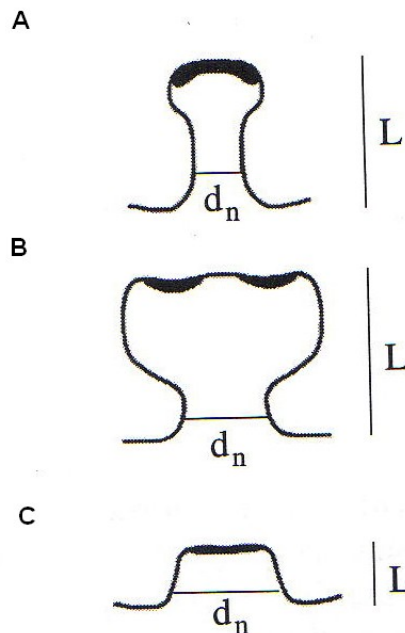


**8 pav.** Dygliuotas dendritas. Šalia pavaizduotas kubas, kurio kraštinė yra  $0,5\mu\text{m}$ . Paimta iš Koch, 1999.

Dėl labai mažų dydžių, galimybė ištirti spainų veiklą atsirado visai neseniai, už tai dėl spainų veiklos buvo iškelta keletas hipotezių. Visų pirma, buvo pradėtos tirti elektroanatomines spainų savybės. Buvo pastebėta, jog nedideli pasikeitimai spaino morfologijoje gali privesti prie didelių žadinančiojo postsinapsinio potencialo, sukkelto žadinančios sinapsės, esančios ant spaino, pokyčių. Dėl to buvo nuspręsta, jog spainai prisideda prie sinapsinio svorio keitimo ilgalaikės potenciacijos metu. Kita hipotezė, iškelta

<sup>7</sup> Protoplazma – pusiau skaidri, klampė gyvoji ląstelės medžiaga, susideda iš karioplazmos ir citoplazmos su joje esančiais ląstelės organoidais.

paskutiniais metais, susitelkia ties spaino gebėjimu suteikti lokalią ir izoliuotą biocheminę sekciją kalciui ir kitiems antriniams pranešėjams, kurių veikla susijusi su sinapsinio plastiškumo sukėlimu ir žadinimu.



**9 pav.** Spainų formų įvairovė. **A** Plonas spainas,  $d_n = 0.10 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ,  $L = 0.98 \pm 0.42 \mu\text{m}$ . **B** „Grybas“ spainas,  $d_n = 0.20 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ,  $L = 1.50 \pm 0.25 \mu\text{m}$ . **C** Kelmuotas spainas,  $d_n = 0.32 \pm 0.13 \mu\text{m}$ ,  $L = 0.44 \pm 0.15 \mu\text{m}$ . Paimta iš Koch, 1999.

Spainų formų būna įvairiausių rūšių – nuo trumpų ir storų iki ilgų ir plonų. Daugelis jų dar ir šakojasi. Turint tokią gausybę formų (9 pav.), yra sunku apibrėžti „vidutinišką“ spainą. Daugelis jų turi aiškiai atskiriamas zonas – „galvą“ ir „kaklą“. Dėl šios savybės ir mažų matmenų, spainai sudaro sudėtingą ląstelinį mechanizmą. Pavyzdžiui, ramybės būsenoje esantis spainas savo  $0,05 \mu\text{m}^3$  galvos srityje gali „priglausti“ tik du neprisijungusius  $\text{Ca}^{2+}$  jonus. Taip kalcis yra izoliuojamas spaino galvoje, kadangi per dar siauresnį spaino kaklą negali difunduoti į dendritinį medį.

## 2.15. Sinapsinis plastiškumas

Neuromoksle sinapsinis plastiškumas yra gebėjimas keisti ryšio tarp dviejų neuronų arba sinapsės stiprumą. Yra keli pagrindiniai mechanizmai, kurie bendradarbiauja, kad pasiektų sinapsinį plastiškumą, apimdami neurotransmiterių kiekio, išleisto į sinapsę, pakeitimus ir pakeitimus to, kaip efektyviai ląstelės atsako į šiuos neurotransmiterius.

Yra žinomi du molekuliniai sinapsinio plastiškumo mechanizmai, atskleisti tyrinėjimo laboratorijose. Pirmas mechanizmas susijęs su jau esančių sinapsinių baltymų (tokių kaip baltymų kinazės) modifikacijomis, kurių rezultatas yra pasikeitusi sinapsinė funkcija. Antras mechanizmas priklauso nuo antraeilių pranešėjų neurotransmiterių, reguliuojančių genų



transkripcija<sup>8</sup> ir esminių baltymų lygio keitimą sinapsėse. Šis antras mechanizmas gali būti sukeltas baltymų fosforilinimo, bet užima daugiau laiko ir trunka ilgiau, aprūpindamas mechanizmą ilgalaikės atminties palaikymu. Ilgalaikiai sinapsinių ryšių efektyvumo pakeitimai (ilgalaikė potenciacija, LTP) tarp dviejų neuronų gali apimti naujų ryšių atsiradimą ar senųjų nutraukimą sinapsėse.

Sinapsės stiprumas taip pat priklauso nuo jonų kanalų skaičiaus, kuriuos ji turi. Yra siūloma, kad neuronai naudoja receptorių tankumo ant jų postsinapsinių membranų keitimą kaip savo sužadavimo keitimo mechanizmą. Dinamiame procese, kuris yra palaikomas pusiausvyroje, NMDA ir AMPA receptoriai yra pridedami prie membranos endocitozės<sup>9</sup> pagalba ir pašalinami egzocitozės<sup>10</sup> pagalba. Šie procesai, tiksliau, receptorių skaičius membranoje, gali būti keičiami sinapsiniu aktyvumu. Bandymai parodė, kad AMPA receptoriai įterpiami į membraną nuolat aktyvuojant NMDA receptorius.

Nuo veikimo potencialų laiko poravimo priklausantis plastiškumas (angl. spike timing dependent plasticity, STDP) yra viena sinapsinio plastiškumo formų, kuri priklauso nuo sinapsinių zonų aktyvacijos. Sinapsinių zonų – presinapsinės ir postsinapsinės – aktyvavimas gali vykti skirtingais laiko momentais. Jeigu presinapsinė zona yra aktyvuojama anksčiau (kelių ar keliasdešimt milisekundžių intervale) už postsinapsinę, yra sakoma, jog laiko poravimas yra teigiamas ( $T > 0$ , čia  $T$  – veikimo potencialų poravimo laikų skirtumas). Ir atvirkščiai, jeigu postsinapsinė zona yra aktyvuojama anksčiau už presinapsinę, sakoma, jog laiko poravimas yra neigiamas ( $T < 0$ ). Dažniausiai pre-post veikimo potencialų poravimas lemia ilgalaikę potenciaciją, o post-pre poravimas – ilgalaikę depresiją.

## 2.16. Ilgalaikiai sinapsiniai pokyčiai

Mokslininkai iki šiol iki galo nesutaria, ką reikia vadinti ilgalaikiais, o ką – trumpalaikiais pokyčiais. Šis skirstymas yra sutartinis. Dažniausiai, trumpu yra laikomas tas, kuris trunka ne ilgiau nei penkias minutes. Ilgiau vykstantys pokyčiai vadinami ilgalaikiais. Tačiau vienas dalykas yra aiškus – trumpalaikiai pokyčiai priklauso tik nuo presinapsinės zonos aktyvacijos, tuo tarpu ilgalaikiams pokyčiams reikalinga ir postsinapsinės zonos aktyvacija.

---

<sup>8</sup> Transkripcija – genetinės informacijos perrašymas – ribonukleorūgšties biosintezė ant deoksiribonukleorūgšties molekules.

<sup>9</sup> Endocitozė - reiškinys kai pūslelės perneša medžiagas į ląstelę. Dalis plazminės membranos įlinksta kurioje nors vietoje į ląstelės vidų apgaubdama medžiagą, kuri bus pernešama į ląstelę, o tada atsiskiria nuo plazminės membranos ir suformuoja pūslelę ląstelės viduje.

<sup>10</sup> Egzocitozė - procesas, kurio metu su ląstelės plazmine membrana susilieja vakuolės, pakrautos tam tikromis medžiagomis. Susiliejimo metu vakuolių viduje buvusios medžiagos atsiduria užląstelinėje erdvėje, o vakuolės membrana tampa plazminės membranos (išorinės membranos) dalimi.

### **2.16.1. Ilgalaikė potenciacija**

Stiprindama sinapsinį perdavimą, ilgalaikė potenciacija gerina dviejų neuronų, vieno presinapsinio ir kito postsinapsinio, ryšį. Tikslūs šio perdavimo stiprinimo mechanizmai nėra aiškūs, kadangi ilgalaikę potenciaciją valdo keli mechanizmai, kurie skiriasi vienas nuo kito įvairiomis savybėmis – smegenų sritimi, gyvūno amžiumi bei rūšimi. Kol kas labiausiai priimtina ilgalaikės potenciacijos forma yra toks pernešimo gerinimas, kurio metu postsinapsinėje zonoje yra didinamas jautrumas signalui, atėjusiam iš presinapsinės zonos. Šie signalai, atėję į ląstelę neurotransmiterių molekulių forma, yra gaunami per receptorių, esančius postsinapsinės zonos membranoje. Ilgalaikė potenciacija gerina pernešimą didindama receptorių aktyvumą neurotransmiteriams.

Ilgalaikė potenciacija dalijasi daugeliu ypatybių su ilgalaikėmis atmintimis, kas daro ją patraukliu kandidatu į ląstelinę mokymosi mechanizmą. Pavyzdžiui, ilgalaikė potenciacija ir ilgalaikė atmintis yra greitai sukeliama procesai, kiekvienas priklauso nuo naujų baltymų sintezės ir kiekvienas gali potencialiai trukti daug mėnesių. Ilgalaikė potenciacija tokiu būdu gali prisidėti prie daugelio mokymosi formų.

### **2.16.2. Ilgalaikė depresija**

Ilgalaikė depresija – tai yra neurono sinapsės silpninimas, kuris gali tęstis nuo kelių valandų iki kelių dienų. Ilgalaikė depresija sukeliama arba dėl stiprios sinapsinės stimuliacijos, arba nuo nuolatinės silpnos sinapsinės stimuliacijos. Yra manoma, jog ilgalaikę depresiją lemia postsinapsinių receptorių tankio sumažėjimas, nors ir presinapsiniai neurotransmiterių paleidimai gali turėti įtakos. Hipokampe vykstanti ilgalaikė depresija gali būti susijusi su senosios atminties „ištrynimu“. Ilgalaikė depresija priklauso nuo NMDA receptorių, metabotropinių glutamato receptorių ir kitų molekulinų procesų.

Paskutiniu metu atsiradus naujiems rezultatams yra manoma, jog didelius vaidmenis ilgalaikiuose procesuose užima fermentai – ir kinazės, ir fosfatazės. Yra teigiama, jog ilgalaikę potenciaciją lemia CaMKII aktyvacija ir jos tipai, tuo tarpu ilgalaikėje depresijoje CaN vaidina analogišką vaidmenį kaip ir CaMKII ilgalaikėje potenciacijoje. Dažniausiai plastiškumo rezultatai lemiami būtent fermentų konkurencija. Reakcijų pasekmės – ilgalaikė potenciacija ar depresija – galima nustatyti pagal atitinkamų molekulių kieki.

### **2.17. Atmintis – ilgalaikė, trumpalaikė**

Psichologijoje, atmintis yra organizmo gebėjimas sukaupti, išsaugoti, ir vėliau atkurti informaciją. Tradicinis atminties studijavimas prasidėjo filosofijos aukso amžiuje, apimdamas techniką dirbtinai didinti atmintį. Vėlyvame devyniolikto amžiuje ir dvidešimto amžiaus

pradžioje pradėta nagrinėti atmintį psichologijos paradigmu rėmuose. Per pastaruosius dešimtmečius, tai tapo viena iš pagrindinių atminties mokslo šakų, vadinamo neuromokslu.

Atmintis neuromoksle turi savo atskirą klasifikaciją. Dažniausiai skiriamos dvi rūšys atminties – trumpalaikė ir ilgalaikė. Priimta manyti, jog ilgalaikė atmintis ir yra pagrindinė atmintis, kurią žmonės saugo visą (žinoma, tai irgi sąlyginis dalykas) gyvenimą. Ligos, tokios kaip Alzheimerio sindromas, Parkinsono sindromas, išsėtinė sklerozė, paveikia būtent tas smegenų sritis ir tuos procesus, kurie, kaip manoma, atsakingi už ilgalaikę atmintį.

Trumpalaikė atmintis gali tęstis nuo kelių sekundžių iki keleto minučių. Dažniausiai tai būna:

Neseniai apdirbtas sensorinis informacijos kiekis (šviesa, garsas, kvapas ir t.t.);

Atminties dalelės, neseniai „ištrauktos“ iš ilgalaikės atminties;

Smegenų veiklos rezultatas, kuris dažnai dar priskiriamas darbinei atminčiai.

Šia atmintimi žmonės gali atsiminti nuo 3 iki 4 dalykų vienu metu (kartais iki 9, priklausomai nuo sąlygų).

Tuo tarpu ilgalaikėje atmintyje galima saugoti nepalyginimai daugiau elementų. Iš esmės, trumpalaikės atminties elementai gali būti pervedinėjami į ilgalaikę atmintį per pakartojimus ir prasmingas asociacijas. Tai atliekama pasitelkus ilgalaikę potencialią, kurios metu neuronai gali atkurti/išauginti/sustiprinti savo ryšius.

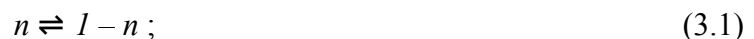
### 3. Fizikiniai ir matematiniai modeliai

Daugelis smegenyse vykstančių procesų yra modeliuojami. Į pagalbą pasitelkiamos fizika, matematika, pastaraisiais metais ir informatika. Norint pritaikyti tam tikrus modeliavimo metodus, pirma reikia nuspręsti, iki kokio detalumo lygio reikia apibūdinti procesą. Tą galima daryti lokaliame ar globaliame lygyje. Kiekvienu atveju gali atsitikti taip, jog modeliai, aprašantys tą pačią sritį, bet kitame lygmenyje, gali skirtis iš esmės. Tokiu pavyzdžiu galime imti membranos lygties sudarymą. Jeigu ją sudarinėjame vienam neuronui vienam laiko tarpui, membranos lygtis atitinka Omo dėsnį. Jeigu pradėsime leisti srovę į ląstelę, turėsime pridėti ir Kirchhofo srovės dėsnį. Kadangi visi procesai keisis laike, reikės pridėti dinamiką – pokyčius per laiko vienetą. Integravimui rinktis patogiausią metodą. Jeigu neuroną imsime su visomis jo erdvinėmis savybėmis, reikės pradėti modeliuoti kabelių lygtis.

Matome, jog viskas priklauso tik nuo detalizacijos lygio. Šiame modelyje tiriamos molekulinės lygtys, kurios aprašomos pirmos eilės kinetinėmis lygtimis. O kadangi sinapsinis svoris yra skaičiuojamas stochastiškai, dalelių aktyvacijos (arba neveiklumas) yra apskaičiuojamos tikimybinio dalelių paleidimo modeliu.

#### 3.1. Pirmos eilės kinetinės lygtys

Tarkime, jog  $k$  aprašo fiktyvios aktyvacijos dalelės būseną. Tai yra bedimensis skaičius, galintis įgauti reikšmes 0 arba 1. Dabar tarkime, kad tikimybė rasti aktyvią dalelę jos laidžioje arba atviroje būsenoje yra  $n$ , o su tikimybe  $1 - n$  galime rasti aktyvią dalelę jos nelaidžioje arba uždaroje būsenoje. Jeigu daugiau neegzistuoja jokių kitų šios dalelės būsenų, o perėjimą iš vienos būsenos į kitą (iš atviros į uždara ir atvirkščiai) valdo pirmos eilės kinetika, galime užrašyti tokią reakcijos schemą:



čia  $\alpha_n$  yra nuo įtampos priklausanti greičio konstanta (matavimo vienetai 1/s), nurodanti, kiek perėjimų įvyksta tarp uždaros ir atviros būsenų, o  $\beta_n$  išreiškia perėjimų skaičių iš atviros į uždara būseną (1/s). Matematiškai šią kinetinę lygtį galime perrašyti į pirmos eilės diferencialinę lygtį:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1-n) - \beta_n(V). \quad (3.2)$$

Sunkiausia yra nustatyti kiekybinę greičio konstantų priklausomybę nuo įtampos  $V$ . Vietoj to, kad naudotume šias dvi konstantas  $\alpha_n$  ir  $\beta_n$ , galime išreikšti jas per nuo įtampos priklausančią laiko konstantą  $\tau_n(V)$  ir nusistovėjusią būseną  $n_\infty(V)$ :

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_\infty - n}{\tau_n}, \quad (3.3)$$

kur

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad (3.4)$$

ir

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n}. \quad (3.5)$$

Formulės (3.2) ir (3.3) yra ekvivalentiškos.

Skaičiavimai, atliekami naudojantis pirmos eilės kinetinėmis lygtimis, vadinami deterministiniais.

### 3.2. Sinapsinis svoris

Sinapsinis svoris neuromoksle yra skaliaras, žymimas  $w_{ij}$  arba  $T_{ij}$ . Tačiau kadangi sinapsės yra labai sudėtingi mechanizmai, jas charakterizuoja nemažas kiekis parametru. Tradiciškai, biofizikai naudoja tris skaliarinius kintamuosius, kurie apibūdina sinapsę: kvantinis paleidimo vietų skaičius  $n$ , sinapsinio paleidimo vietoje tikimybė  $p$  ir postsinapsinio sinapsės efekto matas  $q$ . Priklausomai nuo atliekamų eksperimentų,  $q$  gali būti maksimalus laidumas, maksimali srovė ar dar koks nors prasmingas matas. Realybėje,  $n$  yra gaunamas iš kurio nors tikimybinio dėsnio (dažniausiai naudojamas Puasono dėsnis),  $p$  priklauso nuo ankstesnių veikimo potencialų eigos, o  $q$  yra funkcija nuo laiko. Taigi laiko vidurkio atžvilgiu sinapsės atsakas gali būti išreikštas taip:

$$R = npq. \quad (3.6)$$

Jeigu sinapsėje yra  $n$  paleidimo vietų, kurių paleidimo tikimybė  $p$ , tai tikimybė, kad sinapsė nepaleis neurotransmiterių kaip atsako į stimulą yra

$$P_{\text{nesėkmės}} = (1 - p)^n. \quad (3.7)$$

Tai yra, nesėkmės tikimybė eksponentiškai mažėja, kai didėja paleidimo vietų skaičius. Dar įdomiau yra tai, jog atsako dydžio  $R$  fliktuacijos yra atvirkščiai proporcingos  $\sqrt{n}$ .

Jeigu sinapsė turi kelis tūkstančius paleidimo vietų, nesėkmės tikimybė fiziologinėmis sąlygomis yra labai maža. Tačiau jeigu sinapsė turi tik vieną paleidimo vietą, kurios paleidimo tikimybė yra  $p = 0.3$ , tai nesėkmės įvyksta net iki 70% laiko. Toks perdavimas tampa labai nepatikimas.

### 3.3. Stochastinis algoritmas

Žemiau pateikta schema priskiriama Nakanishi.

Turime reakciją



čia  $k_f$  yra greičio konstanta, o  $A$  ir  $B$  yra molekulių rūšys. Tikimybė, kad molekulė  $A$  nepakeis savo būsenos į  $B$  per laiką  $dt$  yra:

$$p_{Not} = e^{-k_f \cdot dt} \quad (3.9)$$

Tarkime, jog mes turime  $nA$  molekulių, kurios gali pakeisti būseną. Nulinio perėjimų tikimybė yra

$$p_0 = p_{Not}^{nA} = e^{-k_f \cdot dt \cdot nA} \quad (3.10)$$

Jeigu reakcijoje dalyvauja daugiau nei viena molekulė ( $A_1, A_2$  ir t.t.), apibendrintai galime parašyti nulinio perėjimo lygtį:

$$p_0 = p_{Not}^{nA_1 \cdot nA_2 \dots} = e^{-k_f \cdot dt \cdot nA_1 \cdot nA_2 \dots} \quad (3.11)$$

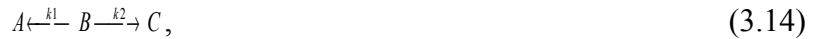
Tada tikimybė, kad dalelė pereis iš būsenos  $A$  į būseną  $B$  yra

$$p_1 = 1 - p_0 = 1 - e^{-k_f \cdot dt \cdot nA} \quad (3.12)$$

Apibendrintas kelių dalelių perėjimas:

$$p_1 = 1 - p_0 = 1 - e^{-k_f \cdot dt \cdot nA_1 \cdot nA_2 \dots} \quad (3.13)$$

Analogiškai, jeigu turime kelis perėjimus



galime surašyti tokias nulinių perėjimų lygtis:

$$p_{0A} = e^{-k_1 \cdot dt}, \quad (3.15)$$

$$p_{0C} = e^{-k_2 \cdot dt} \quad (3.16)$$

Čia  $p_{0A}$  – iš būsenos  $B$  nepereis į būseną  $A$ ,  $p_{0C}$  – iš būsenos  $B$  nepereis į būseną  $C$ . Atitinkamai, perėjimai iš būsenos  $B$  į  $A$  arba  $C$ :

$$p_{1A} = 1 - p_{0A} = 1 - e^{-k_1 \cdot dt}, \quad (3.17)$$

$$p_{1C} = 1 - p_{0C} = 1 - e^{-k_2 \cdot dt} \quad (3.18)$$

Apibendrintai galime parašyti, jo liksime būsenoje  $B$

$$p_{0B} = 1 - p_{1A} - p_{1C} = 1 - (1 - e^{-k_1 \cdot dt} - e^{-k_2 \cdot dt}) \quad (3.19)$$

Turint šiuos, deterministinių ir stochastinių, modelius, galima modeliuoti įvairius procesus, vykstančius smegenyse. Dažnai tenka šiuos du metodus apjungti skaičiavimuose. Vėliau bus kalbama apie tai, kaip tai buvo atlikta Holmso (Holmes, 2000). Šiame skyriuje dar aptarsime vieną metodą, kurį pasiūlė Bala ir Vasudeva (Bhalla ir Vasudeva, 2004).

Savo straipsnyje „Adaptyvioji stochastinė-deterministinė kinetika“ jie pasiūlė tokią aproksimaciją:

$$e^{-x} \sim 1 - x, \text{ kai } x \ll 1. \quad (3.20)$$

Taigi, jei (3.8) reakcijos polinkis yra mažas, pavyzdžiui

$$k_f \cdot dt \cdot nA_1 \cdot nA_2 \dots \ll 1, \quad (3.21)$$

galima apytikriai perrašyti:

$$p0 \sim 1 - kf \cdot dt \cdot nA1 \cdot nA2 \dots \quad (3.22)$$

Pagal šią aproksimaciją gauname, jog

$$p1 \sim (1 - p0) \sim kf \cdot dt \cdot nA1 \cdot nA2 \dots \quad (3.23)$$

ir

$$p1 \ll 1. \quad (3.24)$$

Šio aproksimuoto stochastinio metodo esmė yra numanymas, kad perėjimo reakcijos tikimybė  $p1$  apibrėžiama pagal (3.23) formulę. Naudojantis šia formuluote, kiekvienam reakcijos žingsniui reikia tikrinti, ar  $p1 \ll 1$ . Ir jeigu ši sąlyga nėra tenkinama, reakciją galima skaičiuoti deterministiškai. Tą galima atlikti tada, kai skaičiavimai stochastinėje ir deterministinėje dalyse atliekami naudojant vienodus vienetus, molekulių skaičiaus ir laiko atžvilgiu. Taigi dabar galima taikyti diferencialinius skaičiavimo būdus:

$$\frac{dA1}{dt} = -kf \cdot nA1 \cdot nA2 \dots \quad (3.25)$$

Pasinaudojus Oilerio metodu (galima naudoti bet kurį tinkantį integravimo metodą), gauname tokią išraišką:

$$dA1 = -kf \cdot dt \cdot nA1 \cdot nA2 \dots \quad (3.26)$$

Šio metodo esmė yra ta, jog atliekant vien stochastinius arba vien deterministinius skaičiavimo metodus, dažnai pasitaiko daug skaičiavimo resursų reikalaujančių skaičiavimų. Jeigu vyksta masiniai būsenų pakeitimai, stochastiniai metodai pradeda „kliūti“ šiose vietose, dėl to geriau naudotis deterministiniais metodais, kurie skaičiavimus atlieka nekreipdami dėmesio į molekulių skaičiaus dydį. Dėl to supaprastėja uždavinio sudėtingumas ir taip sutaupoma daug brangių resursų. Taikant aukščiau aprašytą metodą, paprasčiausiai reikia pasirinkti slenksčio dydį, kurį pasiekusi tikimybė  $p1$  lieptų sistemai skaičiavimus tęsti deterministiniu būdu tol, kol sistema grįžta į pusiausvyros būseną, t.y. tada, kai  $p1$  pasidaro žemesnis už nustatytą slenkstį.

## 4. Sinapsių plastiškumo modeliai

Modeliuojant sinapsių dvipusį plastiškumą (t.y. sinapsinio svorio stiprėjimą arba silpnėjimą), paskutiniaisiais metais modelio ašimi yra pasirenkamas kalcio jonų  $Ca^{2+}$  signalas. Nuo jo formos priklauso įvairių molekulių, atsakingų už ilgalaikės potenciacijos ir ilgalaikės depresijos sukėlimą, aktyvumas. Kaip jau buvo minėta, yra pastebėta, jog gana staigus ir didelis  $Ca^{2+}$  jonų pakilimas lemia ilgalaikę potenciaciją, o ilgai veikiantis ir vidutiniškas  $Ca^{2+}$  pakilimas lemia ilgalaikę depresiją.

1949 metais Hebbas (Donald O. Hebb) pateikė dviejų neuronų tarpusavio sąveikos teoriją, kuri buvo pavadinta Hebo teorija. Jis teigė, kad bet kokios dvi ląstelės ar ląstelių sistemos, kurios yra nuolatos aktyvios tuo pačiu metu, bus linkusios tapti veikiančiomis išvien (angl. associated) taip, kad vienos aktyvumas palengvina (angl. facilitate) kitos veikimą. Toks teorijos paaiškinimas yra gana supaprastintas ir jo nereikėtų priimti pažodžiui, dėl to kad nervų sistema yra gerokai sudėtingesnė. Tačiau ši teorija dažniausiai yra iškeliamą, norint paaiškinti kai kuriuos asociatyvinius ląstelių mokymosi tipus, kuriame vienalaikė ląstelių aktyvacija priveda prie ryškaus sinapsinio svorio padidėjimo. Toks mokymasis vadinamas Hebo mokymusi.

Lismanas 1989 metais pasiūlė gana paprastą sinapsinio plastiškumo schemą, kuri paaiškina du kalcio jonų reguliuojamus kelius. Vienas jų priklauso nuo CaMKII aktyvacijos ir yra susijęs su ilgalaikės potenciacijos sukėlimu. Antrasis susideda iš proteinų fosfatazių aktyvacijos, kuri sukelia ilgalaikę depresiją. Šis modelis vėliau buvo praplėstas, pridėjus  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilsoksazolio-4-propioninės rūgšties receptorių (AMPA), kurie yra veikiami dviejų aktyvacijos kelių.

### 4.1. d'Alcantara modelis

Savo straipsnyje, d'Alcantara ir kiti iškelia uždavinį atsakyti į klausimą – ar dvipusis sinapsinio plastiškumo pobūdis gali būti paprasčiausia pasekmė dviejų skirtingų aktyvacijos kelių tam pačiam  $Ca^{2+}$  signalui. d'Alcantara ir kiti pristato  $Ca^{2+}$  kontroliuojamą AMPA receptorių fosforilinimo-defosforilinimo ciklą, kuriuo ieško minimalių sąlygų, kurių reikia dvipusio sinapsinio plastiškumo sukėlimui. Viena pagrindinių jų iškeltų idėjų yra austofosforilintos CaMKII slopinimas inhibitoriumi PP1 (protein phosphatase 1). Atliktos simuliacijos parodė dėl ko ilgalaikė potenciacija ir ilgalaikė depresija yra sukeltos priklausomai nuo kinetinių  $Ca^{2+}$  signalo savybių.

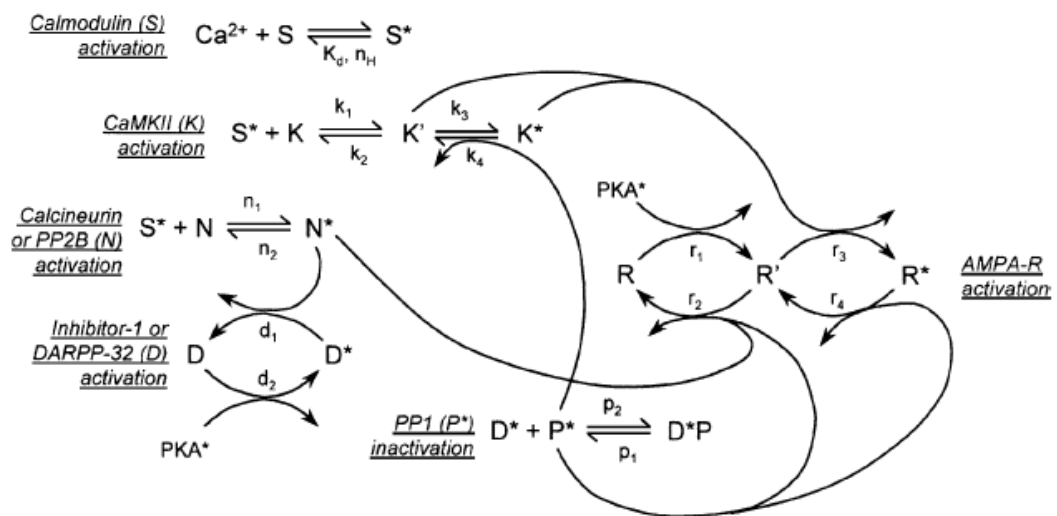


## 4.2. Modelio aprašas

d'Alcantara ir kiti sudarė kelis skirtingus modelius, kurie visi atitiko minimalius reikalavimus, reikalingus  $\text{Ca}^{2+}$  valdomam dvipusiam sinapsiniam plastiškumui. Visuose modeliuose ta pati signalinė molekulė  $S^*$  aktyvuoja du skirtingus kelius, kurie kontroliuoja arba aktyvią atsako molekulės konformaciją  $R^*$ , arba neaktyvią atsako molekulės konformaciją  $R$ . Signalinė molekulė  $S^*$  yra  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  kompleksas ( $\text{CaM}\text{Ca}_4$ ), kuris gali aktyvuoti abu – fosforilinimo ir defosforilinimo – kelius, kurie susiję atitinkamai su AMPA receptorių potenciacija arba depresija.

Modelio schema pateikta 10 paveikslėlyje. Iš visų išbandytų d'Alcantaros modelių, šis labiausiai atitiko realius procesus. Šis modelis susideda iš keturių dalių:  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulino signalo komponentas; CaMKII valdomas aktyvacijos kelias; fosfatazės valdomas neveiklumo kelias; AMPA receptorių atsakas, susidedantis iš aktyvacijos ir neveiklumo.

Kalcio sukeltos CaMKII ir proteino fosfatazės tipas 2B (type 2B protein phosphatase arba calcineurinas) aktyvacijos eksperimentų metu parodo labai panašias teigiamas kooperacijas. Dėl šios priežasties yra manoma, jog visa  $\text{Ca}^{2+}$  jonų valdoma šių enzymų kontrolė apsiriboja kalcio jonų valdoma kalmodulino aktyvacija, kuri stimuliuoja abu (CaMKII ir CaN) kelius.



**10 pav.** Smulki tarpusavyje nepriklausomų aktyvacijos ir slopinimo kelių modelio koncepcija. Modelį sudaro AMPA receptorių fosforilinimo-defosforilinimo ciklas, valdomas CaMKII ir CaN/PP1 kaskadų. Paimta iš d'Alcantara 2003.

Fosforilinimo kelias aprašo CaMKII aktyvaciją. Šiame modelyje aprašytas dviejų etapų modelis, susidedantis iš  $\text{Ca}^{2+}/\text{kalmodulino}$  komplekso  $S^*$  prisijungimo (tai būtų susijungusi CaMKII būseną, schemoje pažymėta  $K'$ ), po kurio seka CaMKII autofosforilinimas (CaMKII atsiduria kaupiančioje būsenoje, schemoje pažymėta  $K^*$ ). Abi šios būsenos yra aktyvios CaMKII būsenos.

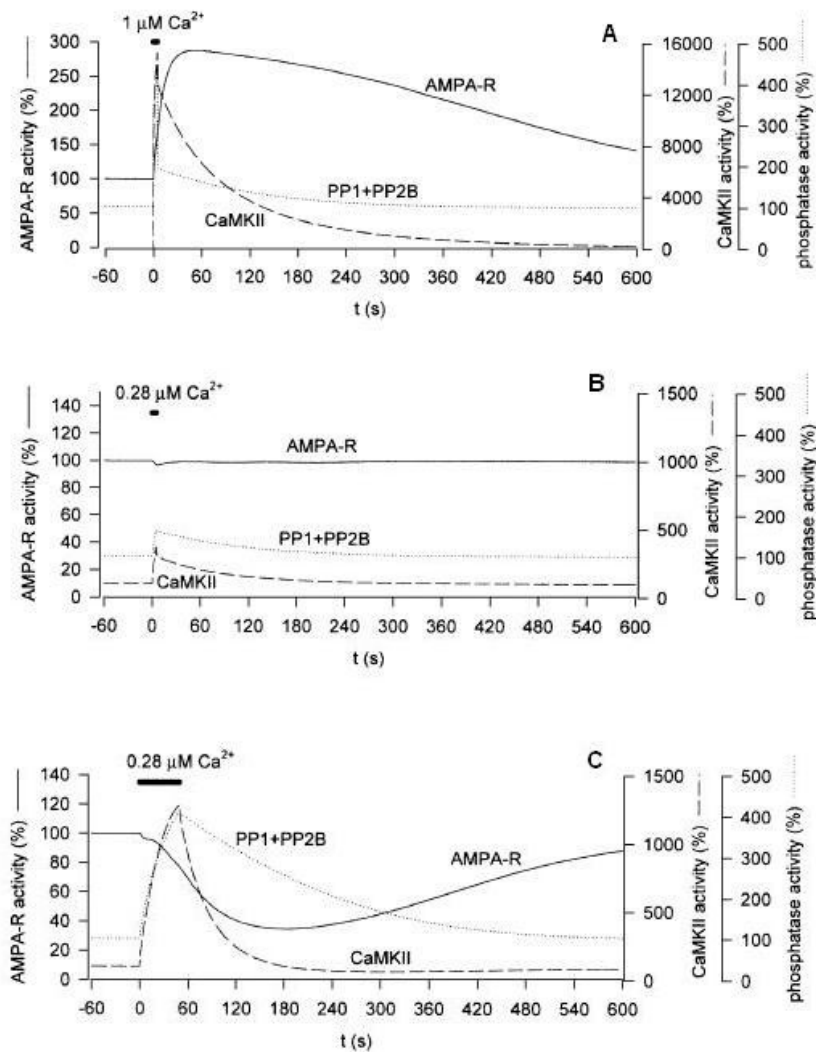
Defosforilinimo kelią sudaro įvykių eilė.  $\text{CaM}\text{Ca}_4$  kompleksas  $S^*$  prisijungia ir aktyvuoja kalcineurinę ( $N$ ). Aktyvus kalcineurinas ( $N^*$ ) defosforilina komponentą  $D$ , kuris šiame modelyje gali būti I-1 inhibitorius arba proteinas DARPP-32. Abu šie proteinais yra proteino kinazės A (PKA) substratai, o jų fosforilintos formos ( $D^*$ ) prisijungia prie ir slopina PP1 fosfatazę (iš  $P^*$  gaunamas  $D^*P$  kompleksas). Taigi komponento  $D^*$  defosforilinimas aktyvia  $N^*$  forma padeda išlaisvinti aktyvią PP1 formą  $P^*$ .

d'Alcantaros modelis aprašo tris skirtingas AMPA receptorių būsenas: visiškai defosforilintą  $R$  būseną, paprastąją  $R'$  būseną (joje yra fosforilinama tam tikra amino rūgšties serino dalis) ir visiškai fosforilintą  $R^*$  būseną. Lyginant AMPA receptorių laidumus, vieno kanalo laidumas padidėja 184% esant aktyviai CaMKII (visiškai fosforilinta  $R^*$  būseną). Paprastoji  $R'$  būseną būna aktyvuota 100% lyginant su defosforilinta būseną. Šie tyrimai rodo, jog vienetinio laidumo padidėjimas bent iš dalies gali paaiškinti CaMKII valdomą ilgalaikę potenciacijos sukėlimą. Iš kitos pusės, nuo  $\text{Ca}^{2+}$  priklausanti defosforilinimo kelio aktyvacija ne tik slopina (angl. depotentiate) AMPA receptorių atsaką PP1 valdomu defosforilinimu, bet taip pat gali sukelti ilgalaikę depresiją, PP1 ir CaN proteinams atliekant defosforilinimą.

### 4.3. Gauti rezultatai

Šis modelis yra paremtas idėja, kad žemose  $\text{Ca}^{2+}$  amplitudėse sąlyginis AMPA receptorių fosforilinimo lygio padidėjimas gali būti tam tikru būdu prislopinamas lyginant su defosforilinimo lygiu (pav. 11-C). T.y. tiesioginis aktyvacijos kelio slopinimas slopinimo keliu. Šis modelis parodo, jog fosforilinimo ir defosforilinimo keliai pateikia kiekybines trukdymo vienas kitam (angl. crosstalk) savybes, kurios lemia skirtingų  $\text{Ca}^{2+}$  signalo formų sukėlimus ilgalaikę potenciaciją arba ilgalaikę depresiją.

Remiantis rezultatais, pateiktais 11 paveikslėlyje ir tarus, jog AMPA receptorių aktyvacija lemia ilgalaikę potenciaciją, o slopinimas – ilgalaikę depresiją, galime patvirtinti anksčiau išsakytą teiginį, kad staigus ir didelis  $\text{Ca}^{2+}$  signalas lemia ilgalaikę potenciaciją (pav. 11-A. Inhibitorių signalas yra per silpnas, kad slopintų CaMKII, dėl to ši yra aktyvesnė ir aktyvuoja AMPA receptorius), o vidutiniškas ir ilgas  $\text{Ca}^{2+}$  signalas lemia ilgalaikę depresiją (pav. 11-C. Inhibitorių signalas suaktyvėja tiek, kad gali veikti CaMKII, ši savo ruožtu tampa nebe tokia aktyvi. Dėl to AMPA receptoriai yra slopinami).



**11 pav.** Kinetinės modelio simuliacijos. **A** 5 sekundžių simuliacija su  $1\mu\text{M Ca}^{2+}$  signalu. **B** 5 sekundžių simuliacija su  $0,28\mu\text{M Ca}^{2+}$  signalu. **C** 50 sekundžių simuliacija su  $0,28\mu\text{M Ca}^{2+}$  signalu. Paimta iš d'Alcantara 2003.

#### 4.4. Holmso modelis

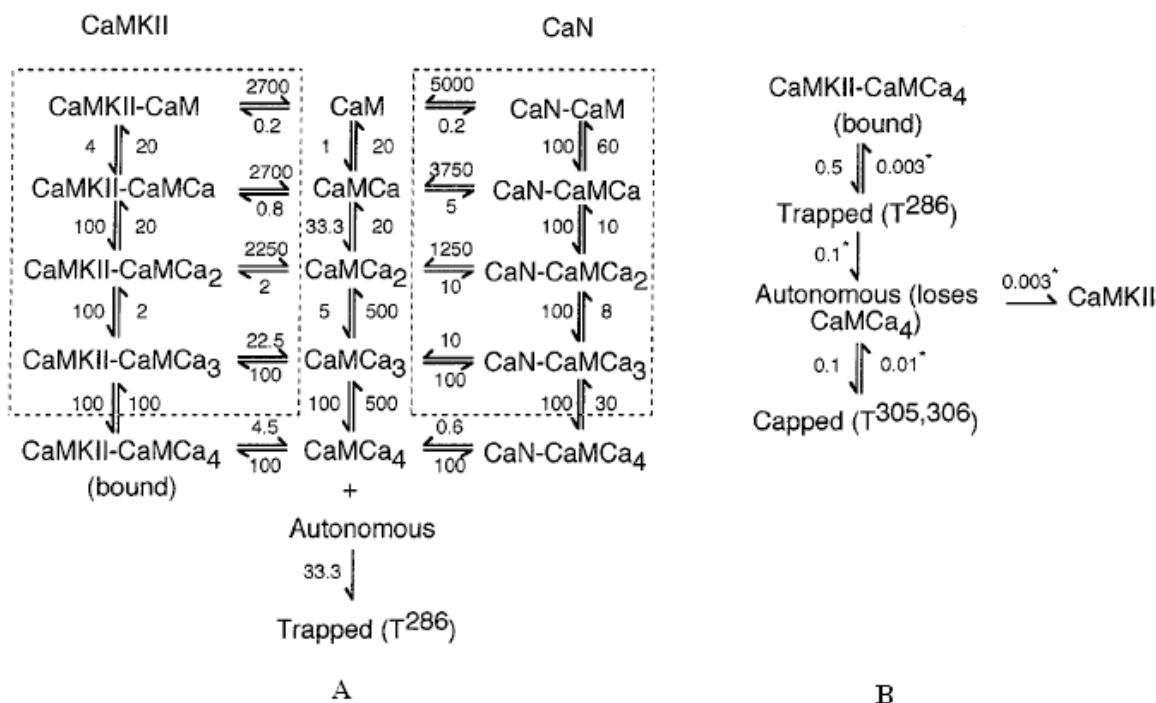
Holmso straipsnyje yra modeliuojama realistiška dantyta granulinė ląstelė, turinti visas fiziologines neurono savybes. Pagrindinis šio modelio tikslas yra išsiaiškinti kaip kalcio signalai priveda prie kalmodulino kaupimo ir nuo kalcio nepriklausomų CaMKII būsenų atsiradimo. Svarbus dalykas yra tai, jog signalas yra ne dirbtinis, o išskaičiuotas, atsirandantis po tetaninio<sup>11</sup> sinapsių stimuliavimo.  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  komplekso prisijungimas prie CaMKII ir CaN yra modeliuojamas deterministiškai, o CaMKII perėjimai tarp aktyvių būsenų yra skaičiuojamas stochastiškai.

#### 4.5. Modelio aprašas

Holmso modelyje modeliuojamas neuronas, į kurį yra paduodami skirtingo dažnio kalcio signalai. Į neuroną per sinapses patenkantis kalcis jungiasi su CaM, o jų kompleksai jungiasi su CaMKII ir CaN. Šios reakcijos pateiktos 12-A paveikslėlyje. Dažniausiai visos

<sup>11</sup> Tetaninė stimuliacija – aukšto dažnio individualių neurono simuliacijų seka.

CaM $\text{Ca}_x$  būsenos galėjo prisijungti prie CaMKII ar CaN, tačiau didžiausią prisijungimo polinkį turėjo CaM $\text{Ca}_4$  kompleksas. Juo labiau, patys enzimai nebuvo labai aktyvinami tų kompleksų, kurie nebuvo pilnai suformuoti. Visos kinetinės lygtys buvo sprendžiamos 4 eilės Rungės-Kutos metodu.



**12 pav.** Kalcio prisijungimas prie kalmodulino ir paskiau vykstančios reakcijos. Reakcijų greičiai pateikti  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  arba  $\text{s}^{-1}$  dydžiais. **A** Reakcijos, modeliuotos deterministiniu būdu. **B** Reakcijos, modeliuotos stochastiniu būdu. Visi reakcijų, pateiktų brūkšnine linija apibrėžtame kontūre, greičiai yra sunkiai išmatuojami dydžiai. Žvaigždutė prie reakcijos greičio reiškia, jog šio dydžio reikšmė buvo kaitaliojama atskirų simuliacijų metu. Paimta iš Holmes, 2000.

Reakcijos, kuriose CaMKII keitė savo aktyviausias būsenas (12-B paveikslėlis), buvo apskaičiuojamos stochastiškai Mičelsono ir Šulmano (Michelson and Schulman) metodu. Reakcijų žingsnių atskyrimas tarp dviejų dalių buvo atliekamas aiškiai atskiriamose laiko skalėse.

Kada CaMKII-CaM $\text{Ca}_4$  komplekso koncentracija 50nm atstumu nuo spaino buvo didesnė už vienos molekulės koncentraciją tame tūryje, buvo skaičiuojamas CaMKII-CaM $\text{Ca}_4$  subvienetų (susijungusių) skaičius. Jeigu susijungusių subvienetų skaičius padidėdavo dydžiu  $x$  lyginant su praėjusiu žingsniu, tada  $x$  atsitiktinai išrinktų laisvų subvienetų turėjo susijungti. Jeigu susijungusių subvienetų sumažėdavo dydžiu  $y$  lyginant su praėjusiu žingsniu, tada  $y$  atsitiktinai išrinktų susijungusių subvienetų turėjo būti išlaisvinami.

CaMKII subvienetų reakcijose susijungę subvienetai galėjo tapti kaupiančiais tik tada, kai jo kaimynas irgi buvo susijungusioje ar kaupiančioje būsenoje (ar su mažesne

tikimybe buvo autonominėje ar užbaigiamojoje būsenose). Simuliacijoje kaimyniniu subvienetu laikomas tik kairėje ar dešinėje pusėje esantis subvienetas.

Kaupiantysis subvienetas tampa autonominiu, jeigu  $\text{CaM}\text{Ca}_4$  kompleksas yra išlaisvinamas, tačiau subvienetas išlieka fosforilinas. Subvienetas negali tapti autonominiu iš laisvos būsenos pirma nepatekęs į kaupiančiąją, kadangi šiai reikalingas  $\text{CaM}\text{Ca}_4$  prisijungimas (susijungusi būseną).

Praradęs  $\text{CaM}\text{Ca}_4$  kompleksą autonominis subvienetas gali būti pradėtas fosforilinti tam tikroje treonino (amino rūgšties) vietoje. Tai gali privesti prie užbaigiamosios būsenos. Užbaigiančioji būseną gali atsirasti tik tada, kai kaimynai, esantys iš kairės ar dešinės pusių, buvo susijungusioje, kaupiančiojoje, autonominėje ar užbaigiančiojoje būsenose.

Nemažai skaičiavimų Holmsio modelyje buvo atlikta norint sužinoti defosforilinimo lygius (greičius). Svarbu paminėti, jog šiame modelyje nebuvo pateikta aiškių įrodymų, kad  $\text{CaN}$  prisijungęs  $\text{CaM}\text{Ca}_4$  kompleksą būtų tiesiogiai atsakingas už  $\text{CaMKII}$  subvienetų defosforilinimą.

#### **4.6. Gauti rezultatai**

Atlikus labai daug bandymų, buvo atskleista nemažai vertingų savybių. Paminėsime tris svarbiausias.

Pirmoji buvo  $\text{CaMKII}$  aktyvacijos ir ilgalaikės potenciacijos sukėlimo tarpusavio santykis. Visose atliktose simuliacijose, kuriose buvo sukelta ilgalaikė potenciacija, aktyviai vyko kalcio koncentracijos pakilimas spaino galvoje, kalcio prisijungimas prie  $\text{CaM}$ ,  $\text{CaM}\text{Ca}_4$  susijungimas, kaupimas ir  $\text{CaMKII}$  aktyvacija. Simuliacijose, kuriose nevyko ilgalaikė potenciacija, vyko gerokai mažiau  $\text{CaM}\text{Ca}_4$  susijungimo, kaupimosi ir  $\text{CaMKII}$  aktyvacijos reakcijų.

Antroji buvo  $\text{CaMKII}$  aktyvacijos priklausomybė nuo kalcio signalo dažnio. Simuliacijų metu buvo leidžiami skirtingi tetaniniai signalai, kuriuose skyrėsi kalcio dažnis. Taip pat buvo keičiami laiko intervalai tarp leidžiamų tetaninių signalų. Skirtingos šių dedamųjų kombinacijos labai ženkliai atsispindėjo  $\text{CaMKII}$  aktyvacijoje ir aktyvių būsenų ilgalaikiame veikime.

Trečioji savybė atskleidė tris atskiras  $\text{CaMKII}$  aktyvacijos fazes. Pirmoje fazėje  $\text{CaMKII}$  buvo stipriai aktyvuota mažiau nei 1 sekundę. Ši aktyvacija stipriai priklausė nuo kalcio signalo. Antroje fazėje  $\text{CaMKII}$  buvo vidutiniškai aktyvuota maždaug 40 sekundžių, ši aktyvacija nuo kalcio nepriklausė. Aktyvacija atitiko kaupiančiųjų subvienetų skaičiui, kurie atsirado pirmojoje fazėje. Trečioje fazėje nuo kalcio nepriklausantis  $\text{CaMKII}$  aktyvumas po truputį leidosi vykstant autonominių ir užbaigiančiųjų subvienetų defosforilinimui. Ši fazė

prasidėjo apie 40 sekundę ir, priklausomai nuo defosforilinimo lygio, galėjo tęstis iki 2 valandų.

Kuri iš šių fazių yra svarbiausia ilgalaikiai potenciacijai? Kol kas nėra aišku. Gal dėl savo ilgos trukmės trečioji būtų pati svarbiausia. Tačiau kai kurie atlikti tyrimai rodo, kad antroji fazė gali būti svarbesnė ilgalaikiai potenciacijai, kadangi likę aktyvūs CaMKII subvienetai trečioje fazėje neturi didelės galimybės prisijungti CaM $Ca_4$ , o tai gali lemti ilgalaikės depresijos sukėlimą (CaN gali pradėti prisijunginėti CaM $Ca_4$  kompleksą).

#### 4.7. Modelių analizė ir palyginimas

Šie du aukščiau aprašyti modeliai analizuoja ilgalaikės potenciacijos ir ilgalaikės depresijos sukėlimą, priklausančius nuo kalcio jonų  $Ca^{2+}$  signalo ir jo sukeltų procesų neurone. Pagrindinė dedamoji abiejuose modeliuose yra  $Ca^{2+}/CaM$  komplekso susiformavimas ir jo įtaka CaMKII ir CaN enzimams. Priklausomai nuo kalcio signalo formos buvo bandoma eksperimentiškai sukelti dvipusį sinapsinį plastiškumą.

Tačiau pirmas pastebimas skirtumas yra kalcio signalo formavimas. d'Alcantaros modelyje kalcio signalas yra dirbtinis – visos simuliacijos metu leidžiamas vieno dydžio kelių sekundžių signalas. Visos deterministinės reakcijos yra formuojamos atsižvelgiant į parametrus, pateiktus literatūroje. Tuo tarpu Holmsio modelyje daug dėmesio yra skiriama realistiškam neuronui – imamos visos fiziologinės savybės, priklausančios neuronui. Formuojamas kalcio signalas taip pat yra realistiškas, apskaičiuotas leidžiant į neuroną tetaninius impulsus.

Holmsas savo modelyje pateikia išsamų CaMKII-CaM $Ca_4$  komplekso suformavimą (taip pat ir CaN-CaM $Ca_4$  suformavimą). Vėliau stochastiškai apskaičiuoja CaMKII aktyvių būsenų kaitą. d'Alcantara savo ruožtu iš karto formuoja CaM $Ca_4$  kompleksą ir jo prisijungimą prie CaMKII ir CaN (nėra jokių tarpinių reakcijų), o CaMKII būsenų kaita yra apskaičiuojama deterministiškai. Tarpinių būsenų reakcijos ne visada yra tiek svarbios, kaip buvo minėta Holmsio straipsnyje. Tačiau stochastinis būsenų kaitos modelis leidžia realistiškiau žvelgti į šiuos procesus, kadangi būsenų kaita yra priklausoma nuo esančių aplinkui molekulių (kaimynų).

Dar vienas labai didelis skirtumas tarp šių modelių yra fosforilinimo ir defosforilinimo kelių skirtumai. d'Alcantaros modelyje defosforilinimo kelias turi labai didelės įtakos ilgalaikiai potenciacijai ir ilgalaikiai depresijai, juo labiau, defosforilinimo kelias taip pat daro įtaką fosforilinimo keliui. T.y. inhibitoriai gali lemti ilgalaikių CaMKII būsenų aktyvacijas ir jų trukmę. Holmsio modelyje kinetinės CaM $Ca_x$  komplekso prisijungimo reakcijos neturi tarpusavio įtakos enzimams. Kaip jau buvo minėta, Holmsio modelyje nebuvo pastebėta CaN defosforilinimo įtakos CaMKII. Tik iš atliktų eksperimentų galime pamatyti, jog tam tikru

metu kinazė ar fosfatazė „laimi“ enziminę konkurenciją, ir taip nuspręsti kas tuo metu, ilgalaikė potenciacija ar ilgalaikė depresija, vyksta.

Taip pat esminis skirtumas yra modelių rezultatai – ilgalaikės potenciacijos ar ilgalaikės depresijos sukėlimas. Holmso modelyje eksperimento baigtį lemia CaMKII aktyvios būsenos. O d'Alcantaros modelyje rezultatai nustatomi pagal AMPA receptorių laidumą (aktyvumą).

Apibendrintai galima būtų pasakyti, kad Holmso modelis suprojektuotas atsižvelgiant į realias neurono savybes, taip pat aprašytos deterministinės CaMKII ir CaN susijungimo reakcijos su CaM $Ca_x$  kompleksais bei stochastinės CaMKII aktyvių būsenų kaitos reakcijos labiau atitinka biofizikinius procesus, reikalingus mokymuisi. Tačiau d'Alcantaros modelyje detaliau aprašyti fosforilinimo ir defosforilinimo keliai – jų įtaka vienas kitam bei įtaka galutiniams rezultatams. Taip pat AMPA receptorių įtraukimas į modelį padeda suprasti modelio rezultatus ne vien kaip enzimų konkurencijos išvadą, bet ir kitų biofizikinių procesų įtaką ilgalaikėi potenciacijai ar ilgalaikėi depresijai.

Šiuos abu modelius taikysime norėdami ištirti sinapsinio plastiškumo savybes, kurios priklauso nuo sinapsės vietos.

## 5. Modelių tyrimai

Suprojektuoti Holmsio ir d'Alcantaros dvipusio sinapsinio plastiškumo modeliai pagal pateiktus straipsniuose parametrus. Pasitelkus į pagalbą MS Visual Studio 2005 paketą, buvo suprogramuoti abu modeliai. Neatliekant jokių modifikacijų pirmiausiai norėta įsitikinti, ar gaunami tie patys rezultatai. Deterministiniai ir stochastiniai metodai apskaičiuojami trečiame skyriuje pateiktais metodais. Holmsio modelyje integruojama 4 eilės Rungės-Kutos metodu (kaip ir buvo siūloma originaliaame modelyje), o d'Alcantaros modelyje reakcijos integruojamos Oilerio metodu. Atlikus eksperimentus ir pritaikius pradines sąlygas buvo gauti analogiški rezultatai, pateikti straipsniuose.

Dėl anksčiau aptartų modelių skirtumų, buvo nuspręsta apsisistoti ties Holmsio modeliu, kadangi jame projektuotas neuronas ir leidžiami kalcio signalai yra labiau atitinkantys realybę. Dėl to galime spręsti, jog ir gaunami rezultatai yra įtikinamesni. Visuose atliekamuose eksperimentuose bus naudojami kalcio signalai, apskaičiuoti spainuose, esančiuose arti ir toli nuo somos. Kalcio signalams gauti panaudotas realistišką CA1 piramidinio neurono modelis (Poirazi ir kiti, 2003), įgyvendintas NEURON programinėje aplinkoje (duomenys gauti iš Vytauto Didžiojo Universiteto).

### 5.1. Modelio įgyvendinimas

#### 5.1.1. Kalcio signalo forma

Visų pirma norėta įsitikinti, jog modelis gali pateikti enzymų konkurencijos rezultatą. Tam į pagalbą buvo pasitelktas dirbtinis kalcio signalas, formuojamas pagal (5.1) formulę:

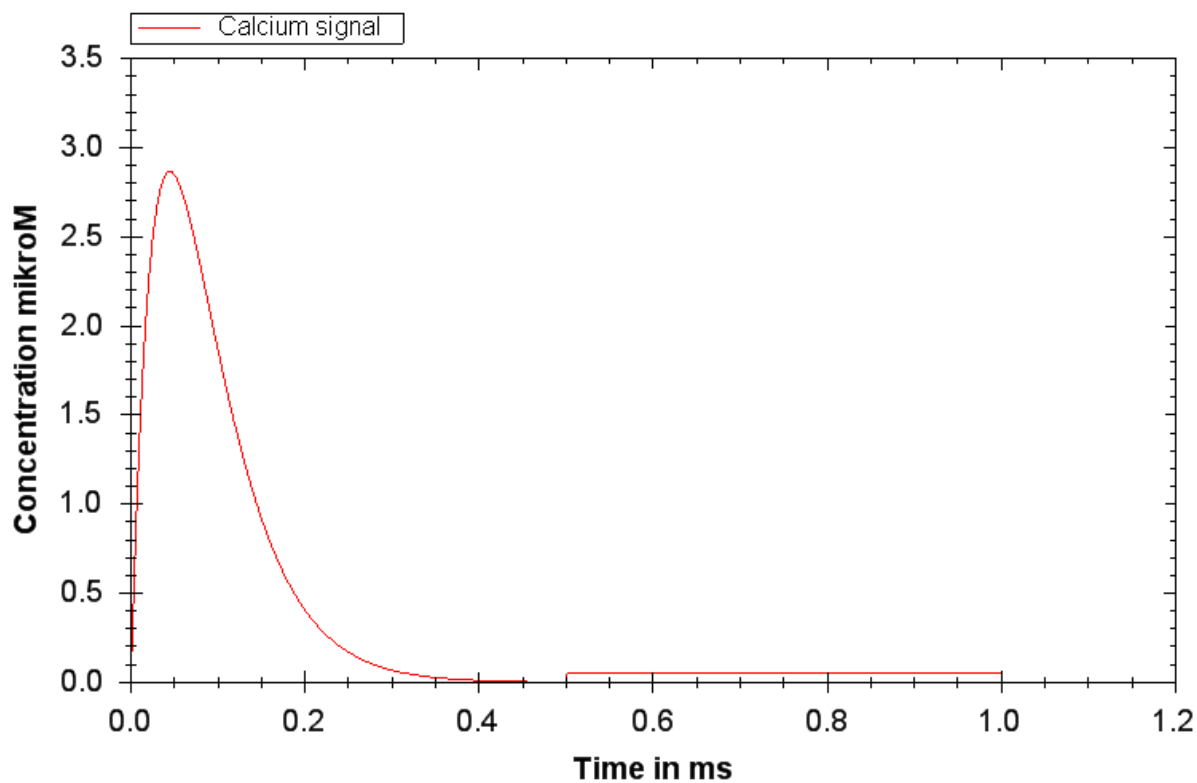
$$conc = A \left( e^{\frac{-t}{\tau_1}} - e^{\frac{-t}{\tau_2}} \right), \quad (5.1)$$

čia  $A$  – konstanta, lemianti kalcio signalo amplitudės aukštį, konstantos  $\tau_1$  ir  $\tau_2$  lemia kalcio signalo kilimo-leidimosi fazių plotį. Dirbtinio kalcio signalo pavyzdžiai pateikti 13 ir 14 paveikslėliuose. Matyti, jog prie didesnių  $\tau_1$  ir  $\tau_2$  reikšmių dirbtinis kalcio signalas yra kiek platesnis – turi ilgesnę nusileidimo fazę.

Atlikome bandymus su dirbtiniu kalcio signalu, kur  $\tau_1 = 0,05$  ir  $\tau_2 = 0,04$ , o  $A$  kito taip, kad kalcio signalo maksimumas būtų tarp  $[0,8; 10]$   $\mu\text{M}$ . Tyrimo metu buvo fiksuojami kalcio, CaMKII (visų jos aktyvių būsenų) ir CaN maksimumai. Gautas rezultatas (15 pav.) patvirtina enziminės konkurencijos buvimą.

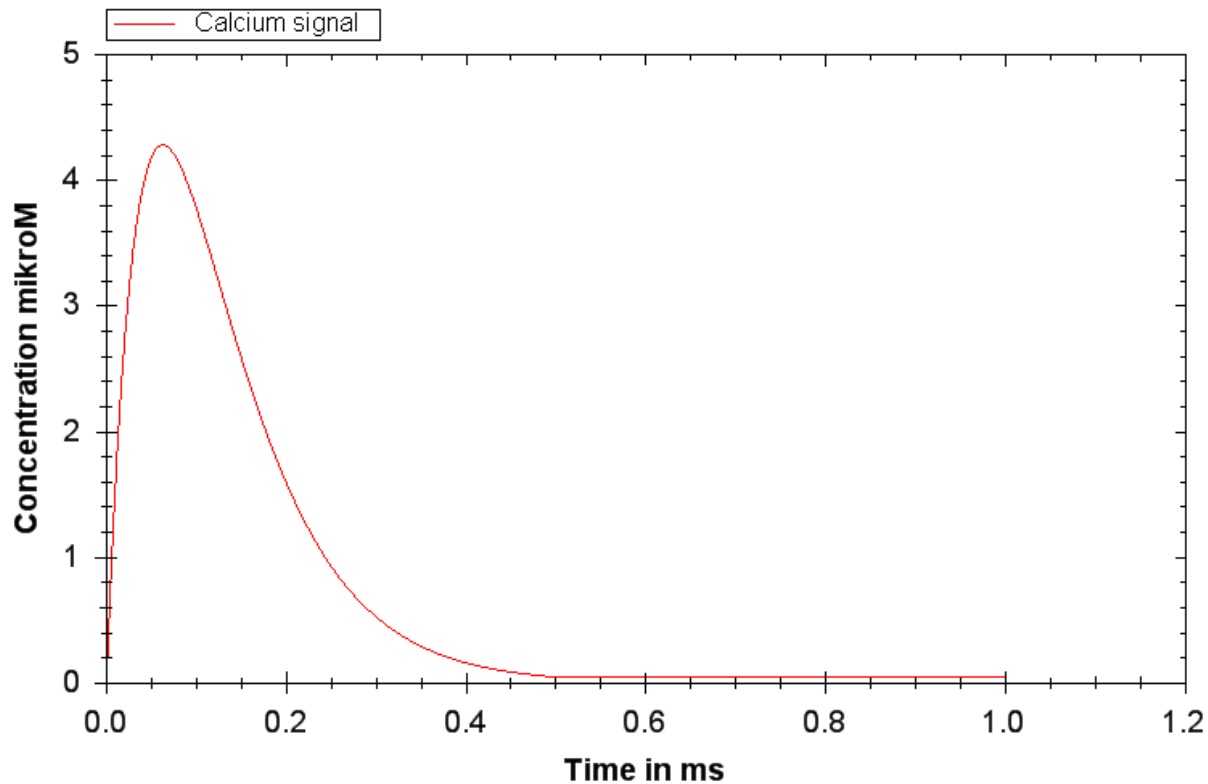


### Calcium Signal

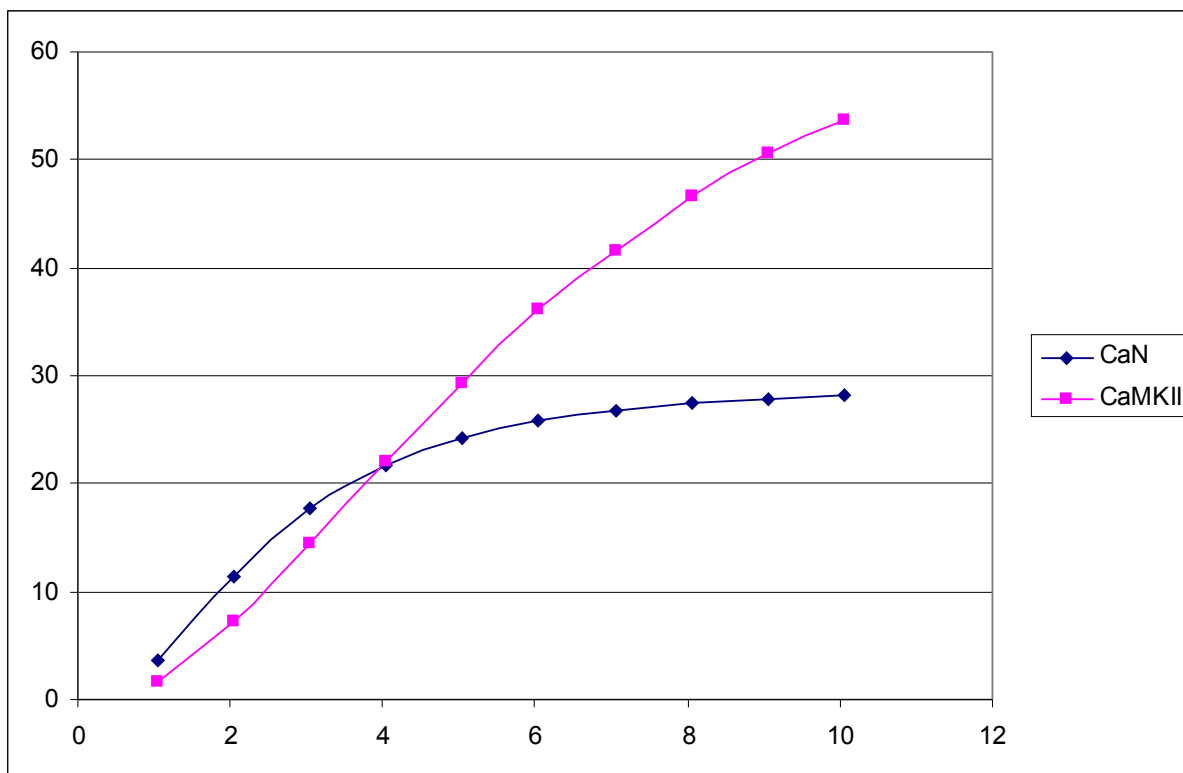


13 pav. Dirbtinis kalcio signalas.  $\tau_1 = 0.05$ ,  $\tau_2 = 0.04$ ,  $A = 35$ .

### Calcium Signal



14 pav. Dirbtinis kalcio signalas.  $\tau_1 = 0.08$ ,  $\tau_2 = 0.05$ ,  $A = 25$ .

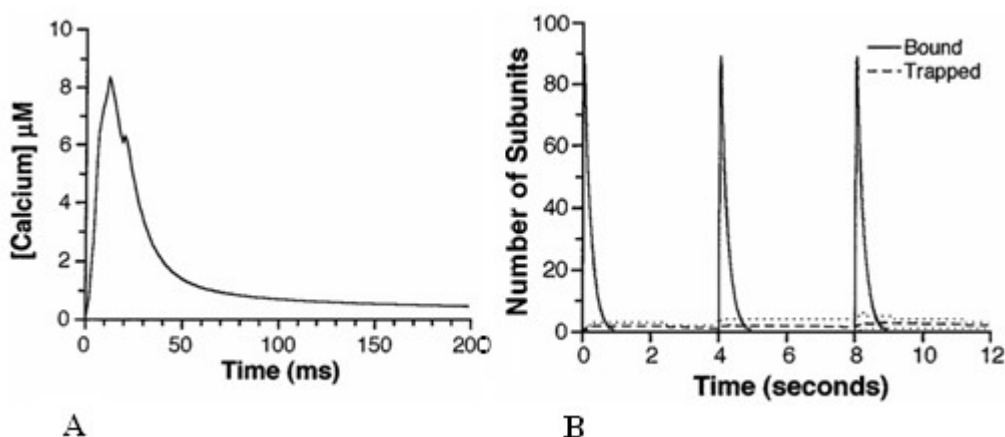


**15 pav.** Grafike pateikta kalčio, CaMKII ir CaN maksimumų priklausomybės. Dydžiai matuojami  $\mu\text{M}$ . Matome, jog esant tam tikrai kalčio koncentracijai CaMKII pralenkia CaN.

Įsitikinus jog modelis patvirtina enziminės konkurencijos hipotezę su dirbtiniais signalais, galima atlikti eksperimentus su realiais kalčio signalais.

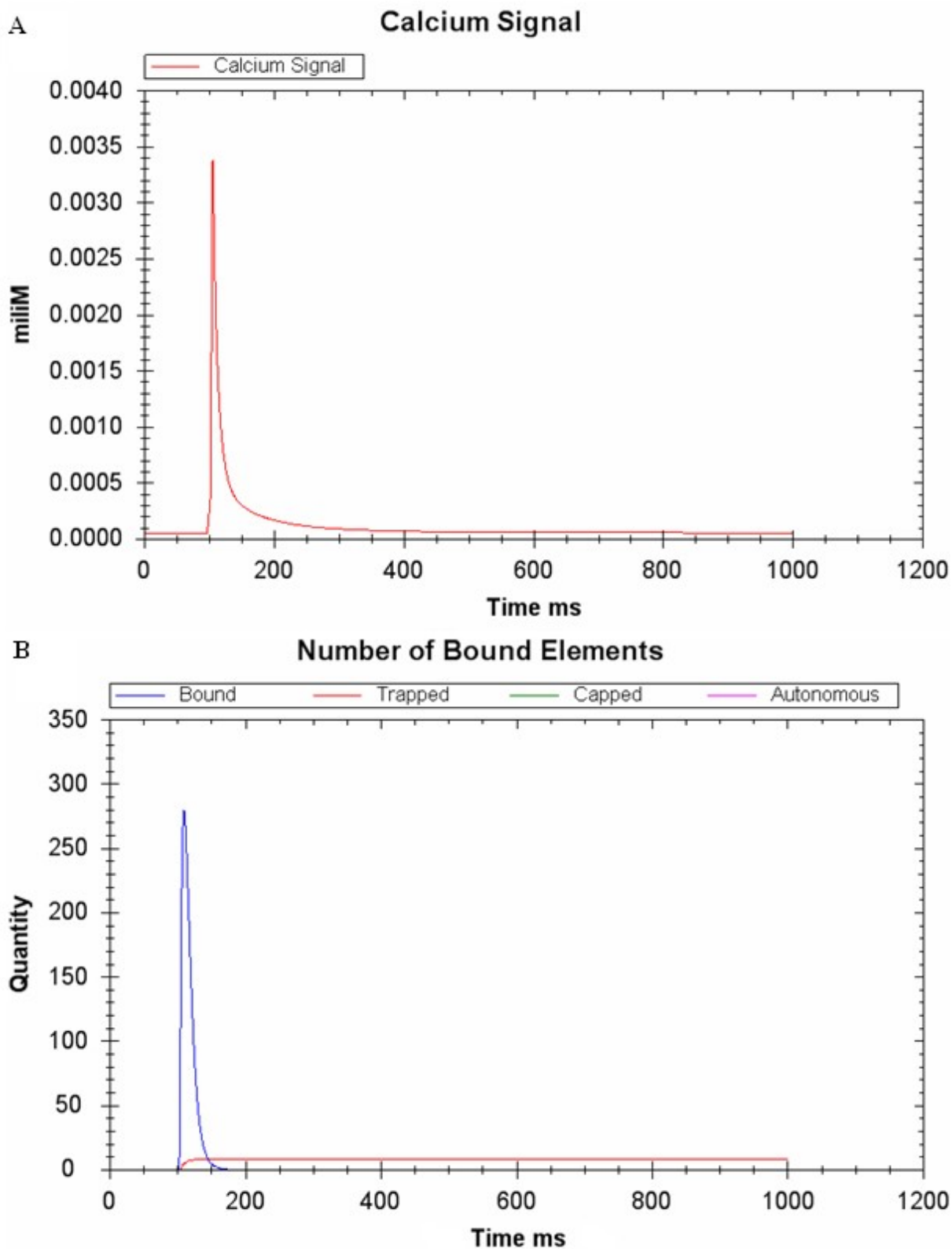
### 5.1.2. Realūs kalčio signalai Holmso modelyje

Holmso modelyje eksperimentai atliekami esant tokiai kalčio koncentracijai spaino galvoje, parodytoje 16-A paveikslėlyje. Esant tokiam signalui nevyko praktiškai jokie CaMKII perėjimai į kaupiančiąją būseną. Rezultatai pateikti 16-B paveikslėlyje.

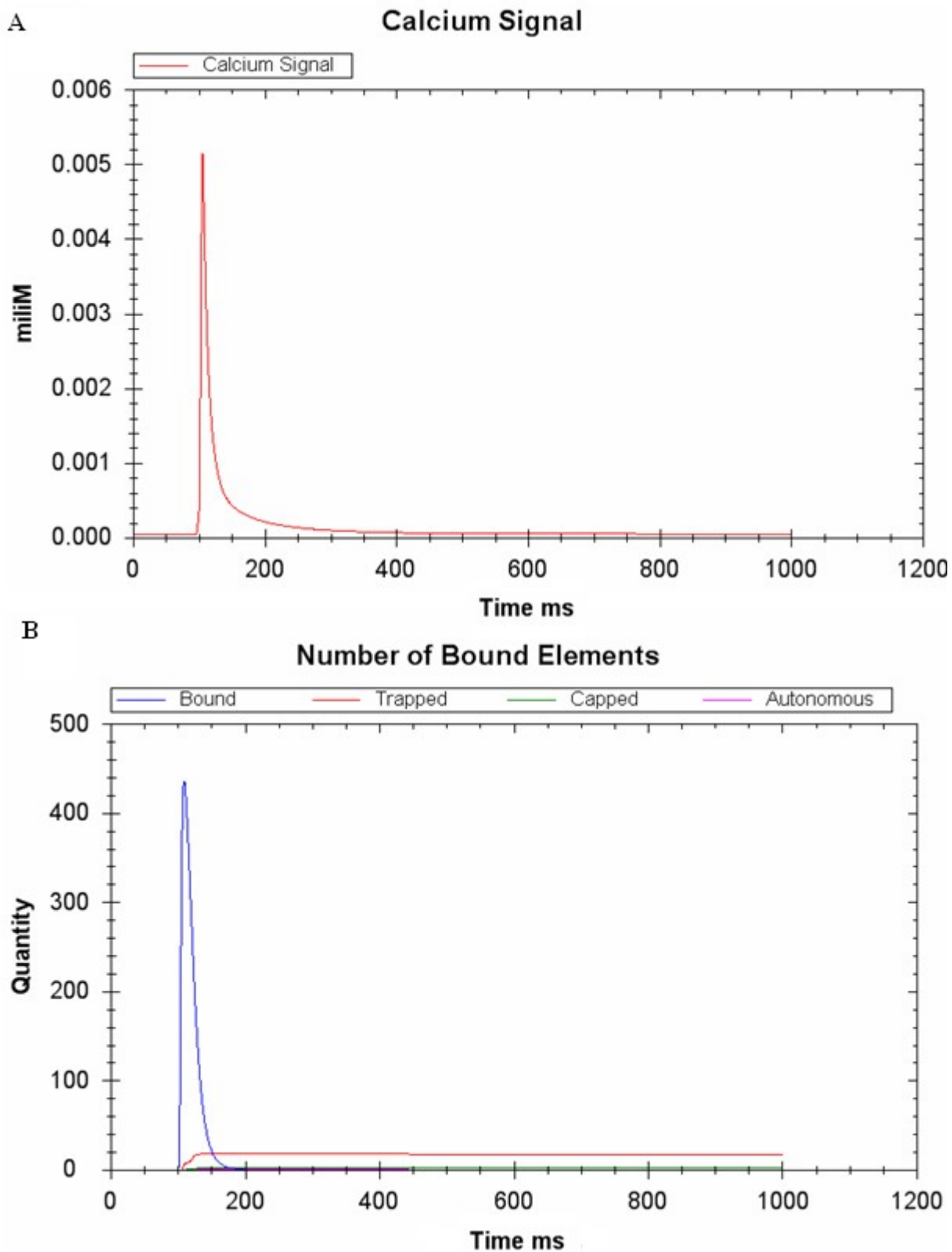


**16 pav.** Žemo dažnio stipri stimuliacija modeliuotoje sinapsėje. **A** Kalčio koncentracija spaino galvoje. **B** CaMKII subvienetų skaičius, kurie yra susijungusioje ar kaupiančiojoje būsenoje (bound ir trapped). Paimta iš Holmes 2000.

Atlikime eksperimentus su realiais kalčio signalais arti ir toli nuo somos. Rezultatai pateikti 17 ir 18 paveikslėliuose.



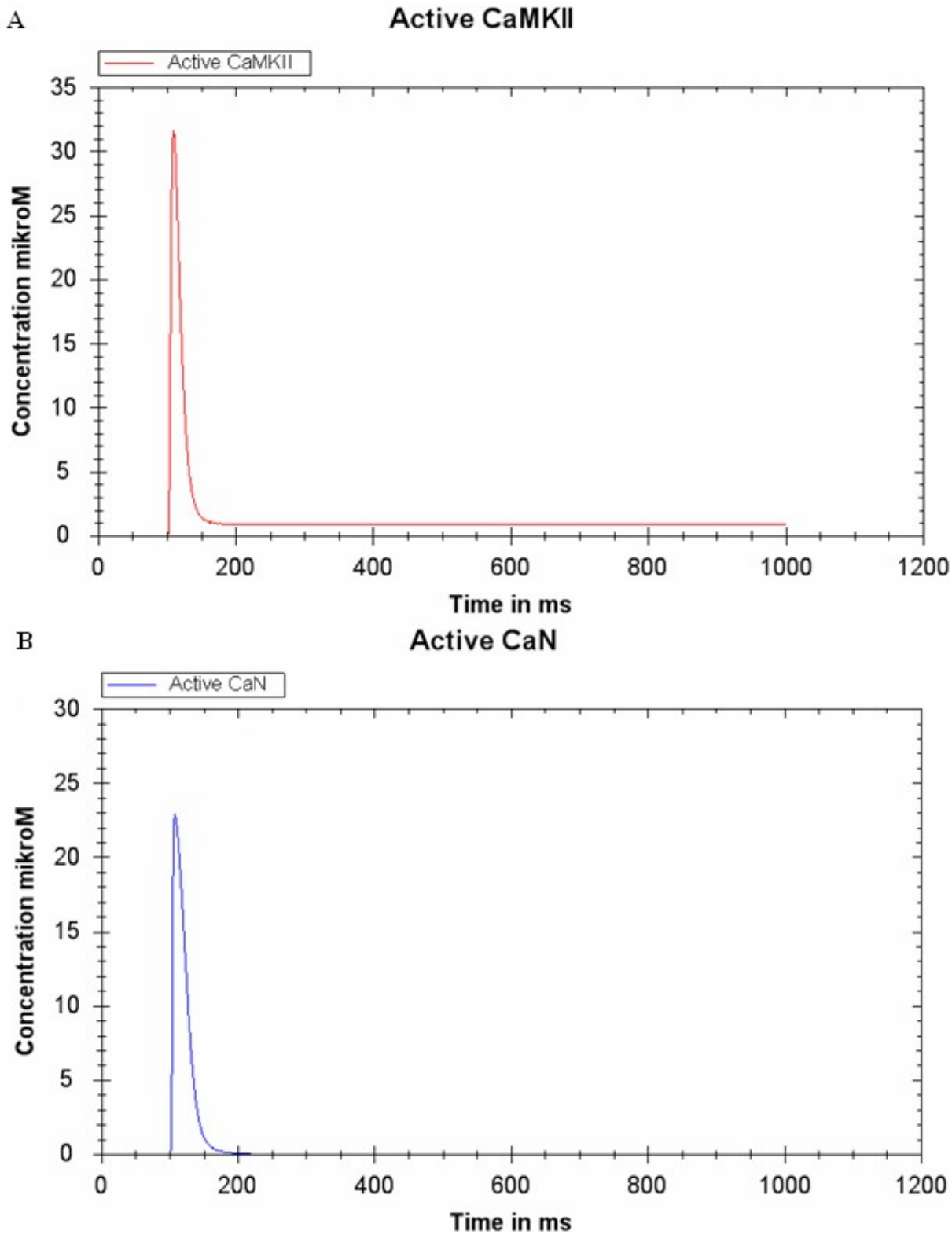
**17 pav.** Eksperimentas naudojant realų kalcio signalą arti somos.  $T = 5$  ms. **A** Kalcio signalas. **B** CaMKII aktyvių būsenų subvienetų skaičius. Kaip matyti, kaupiančiosios būsenos subvienetų skaičius labai mažas.



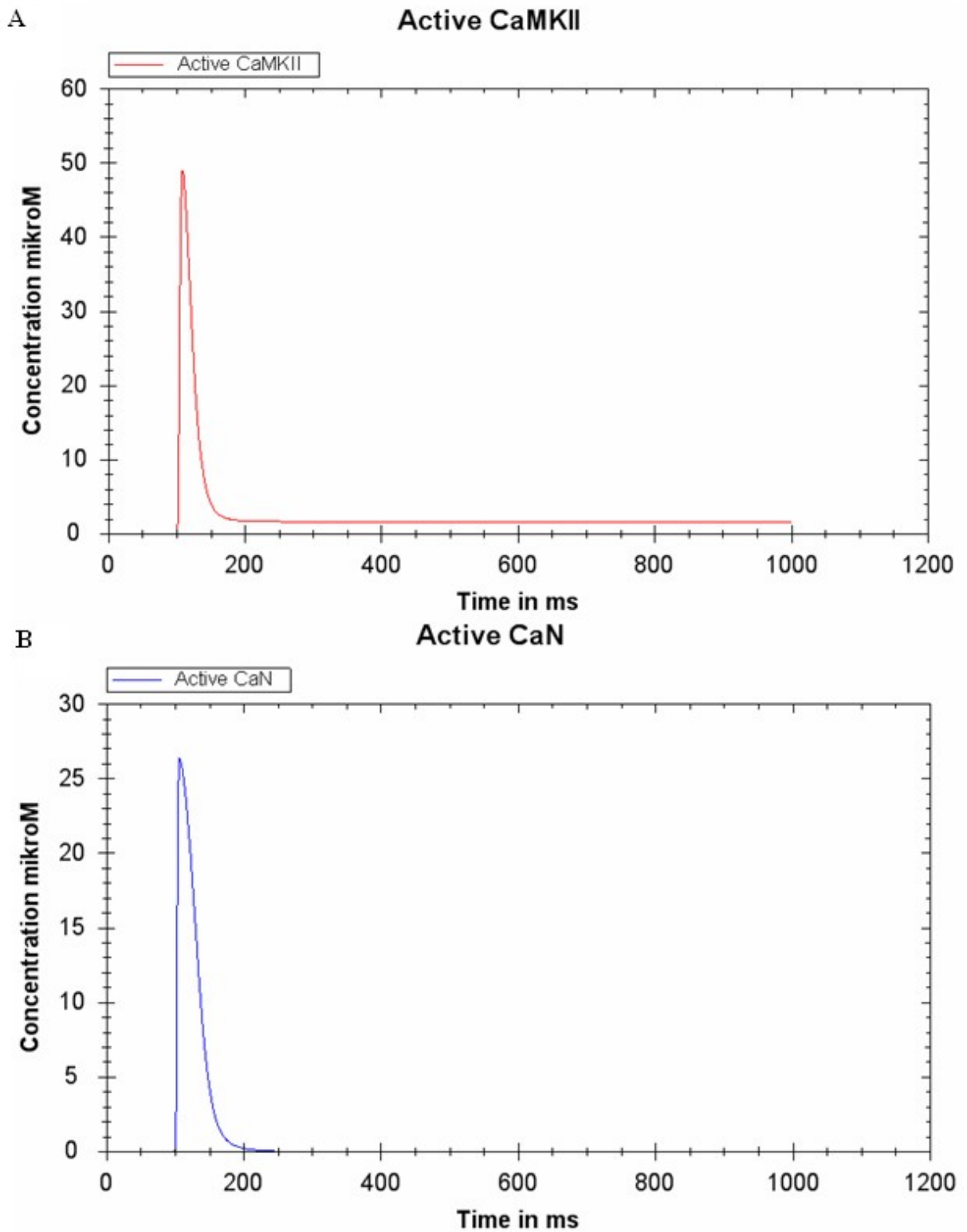
**18 pav.** Eksperimentas naudojant realų kalcio signalą toli nuo somos.  $T = 5$  ms. **A** Kalcio signalas. **B** CaMKII aktyvių būsenų subvienetų skaičius. Kaip matyti, gali atsirasti ir kitų CaMKII aktyviųjų būsenų.

Visų pirma, galima atkreipti dėmesį į tai, jog kalcio koncentracija tolimajame spaine yra didesnė už koncentraciją artimajame spaine. Greičiausiai dėl to, tolimajame spaine aktyvių CaMKII subvienetų skaičius yra didesnis (palyginimui 17-B ir 18-B paveikslėliai) – kaupiančiosios (anlg. trapped) būsenos subvienetų kiekis tolimajame spaine yra maždaug dvigubai didesnis nei arti somos esančiame spaine.

Kaip yra postuluoama, ilgalaikė potenciacija vyksta esant teigiamam laiko poravimui tarp veikimo potencialų. 19 ir 20 paveikslėliuose pateiktos CaMKII ir CaN koncentracijos artimajame ir tolimajame spainuose. Matome, jog CaMKII koncentracija lenkia CaN koncentraciją. Abiejuose eksperimentuose enziminę konkurenciją „laimi“ kinazė.

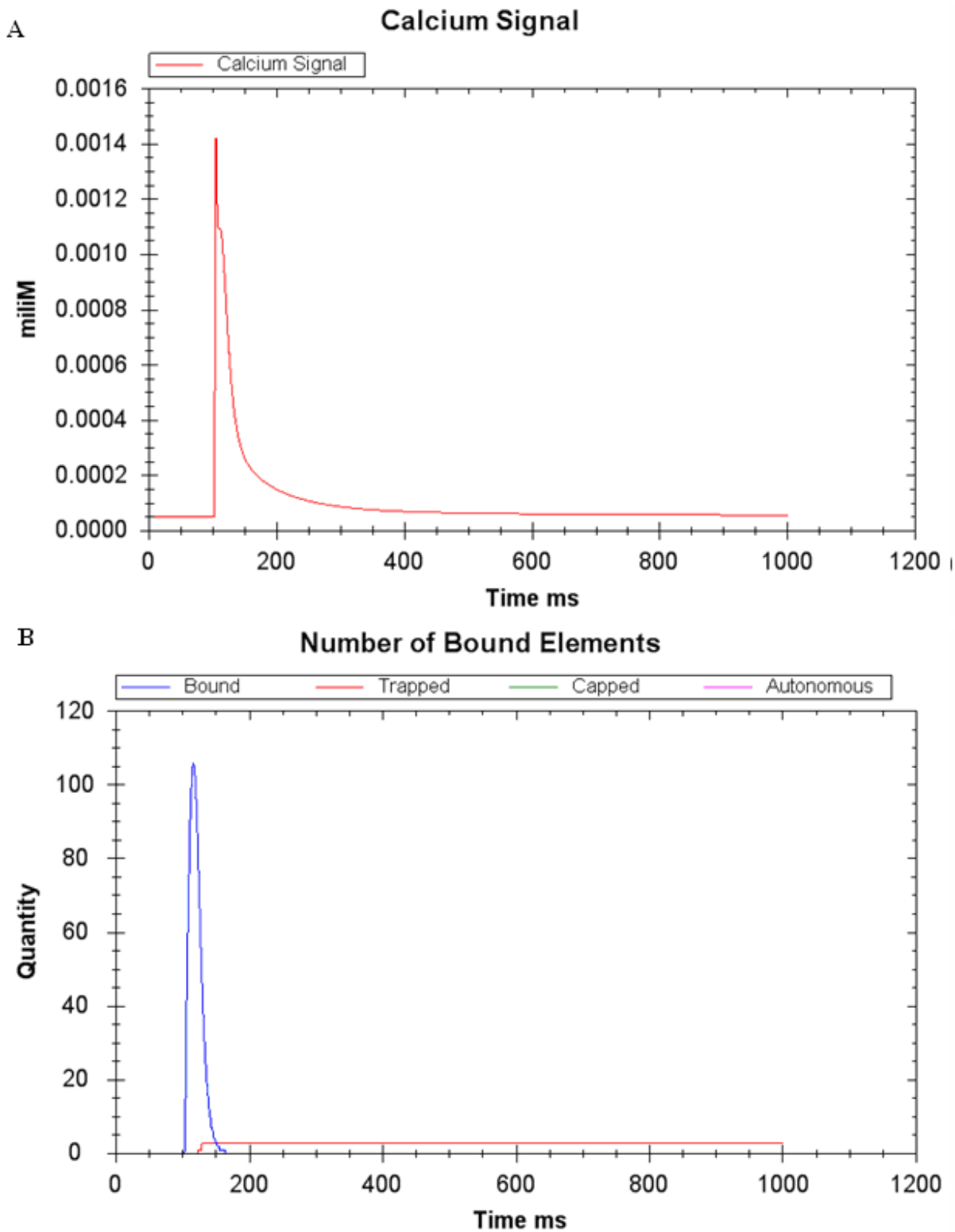


**19 pav.** Signalas arti somos,  $T = 5$  ms. CaMKII (visų aktyvių būsenų) koncentracija lenkia (A) CaN koncentraciją (B).



**20 pav.** Signalas toli nuo somos,  $T = 5$  ms. Analogiškai signalui arti somos, CaMKII (visų aktyvių būsenų) koncentracija lenkia (A) CaN koncentraciją (B).

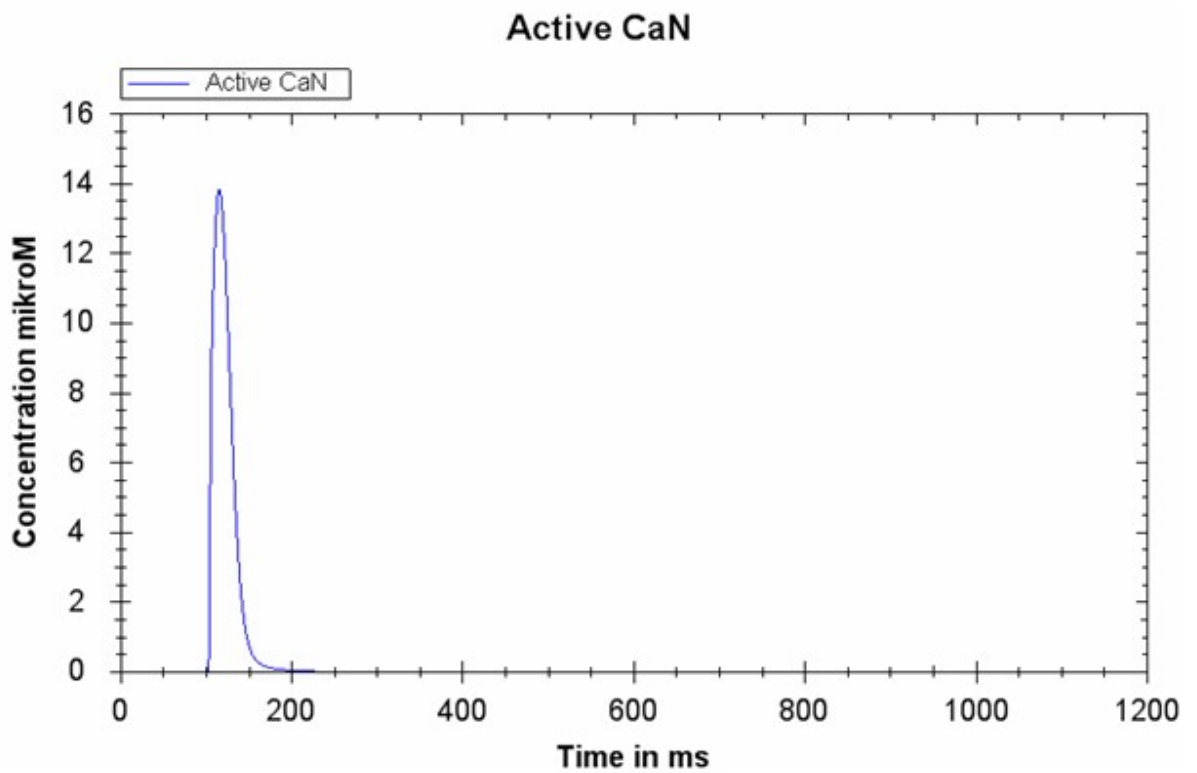
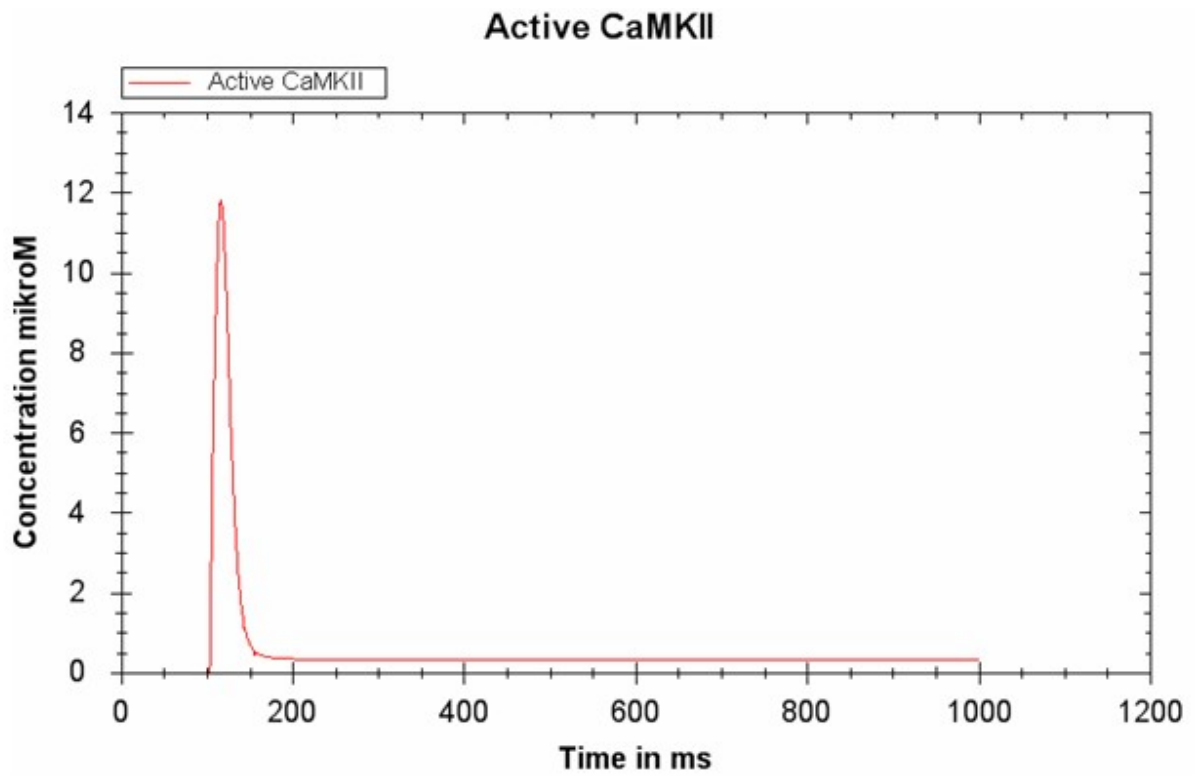
Atliktuose eksperimentuose gali būti stebima ilgalaikė potenciacija. Atlikime analogiškus eksperimentus, kai laiko poravimas tarp veikimo potencialų yra neigiamas. Rezultatai pateikti 21-24 paveikslėliuose.



**21 pav.** Signalas arti somos,  $T = -5$  ms. **A** Kalcio koncentracija. **B** CaMKII aktyvių subvienetų kiekiai.

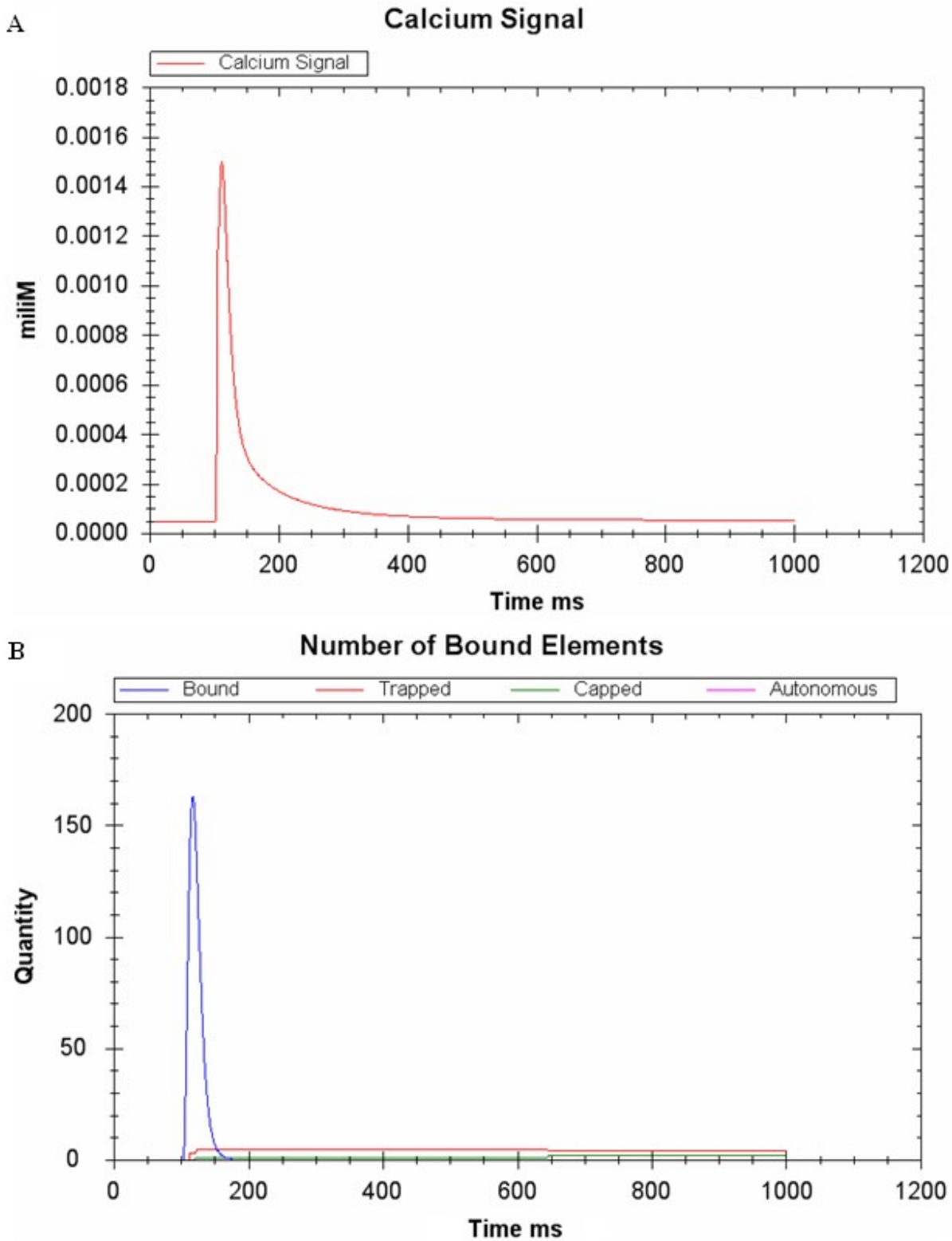
Palyginus šiuos rezultatus su 17 paveikslėlyje pateiktais rezultatais, matome, jog ir kalcio koncentracija yra gerokai mažesnė pastarajame, ir CaMKII aktyvių subvienetų skaičius yra kelis kartus mažesnis.





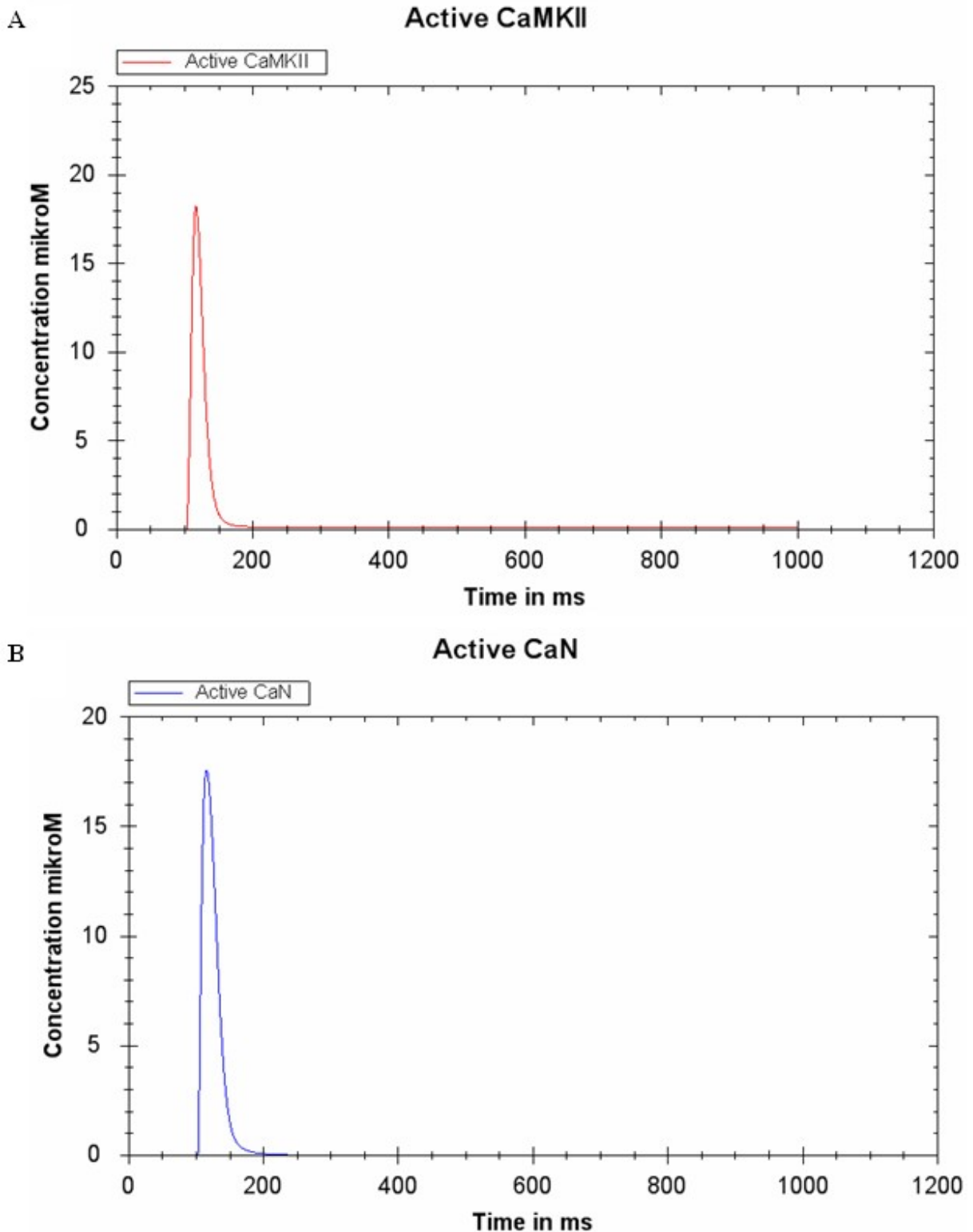
**22 pav.** Signalas arti somos,  $T = -5$  ms. **A** CaMKII visų aktyvių būsenų koncentracija. **B** CaN koncentracija.

Šiuo atveju, kalcineurinas, nors ir nežymiai, tačiau lenkia CaMKII aktyvių būsenų koncentracijas. Vadinasi, galima stebėti ilgalaikę depresiją.



**23 pav.** Signalas toli nuo somos,  $T = -5$  ms. **A** Kalcio koncentracija. **B** CaMKII aktyvių subvienetų kiekiai.

Situacija analogiška aprašytai anksčiau – žemesnė kalcio koncentracija, mažiau CaMKII aktyvių subvienetų. Tačiau kartais būna ir autonominių ar užbaigiančiųjų subvienetų.



**24 pav.** Signalas toli nuo somos,  $T = -5$  ms. **A** CaMKII visų aktyvių būsenų koncentracija.

**B** CaN koncentracija.

Šioje situacijoje sunku nuspręsti, kokį procesą – ilgalaikę potenciaciją ar ilgalaikę depresiją – stebėsime. CaMKII ir CaN koncentracijų lygiai apytikriai vienodi. Kadangi CaMKII perėjimas tarp aktyvių būsenų yra stochastinis, reikėtų atlikti daugiau simuliacijų ir išvesti koncentracijų maksimumų vidurkius. Tačiau aišku viena – nors ir paduodamas ne

tetaninis signalas, tolimajame spaine esant laiko poravimui  $T = -5$  ms vienareikšmiškai negalima nuspręsti jog bus stebima ilgalaikė depresija.

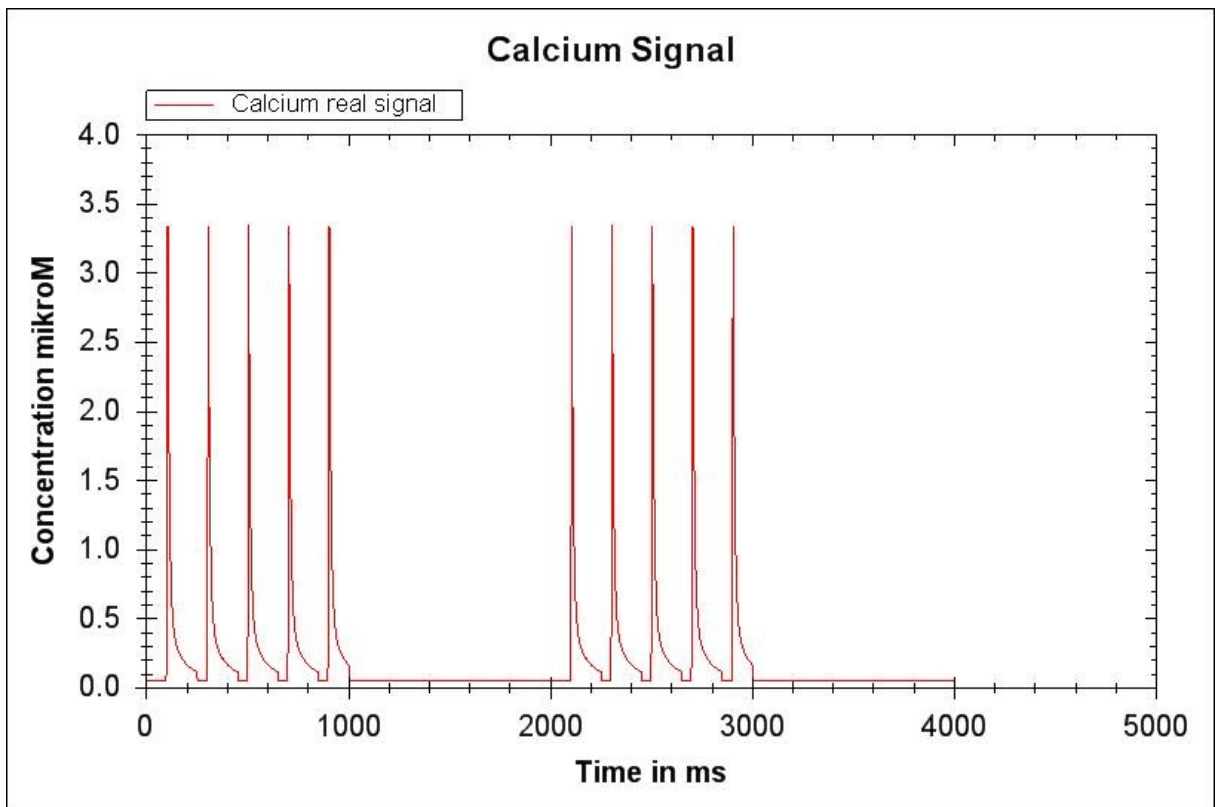
Taip pat, palyginus 17 – 24 paveikslėlius galima pastebėti tendenciją – kol veikia kalcio signalas, tol atsiranda aktyvių CaMKII-CaM $Ca_4$  ir CaN-CaM $Ca_4$  kompleksų. Tai matyti iš kalcineurino koncentracijų grafikų bei CaMKII susijungusios būsenos subvienetų skaičiaus kitimo. Kai tik kalcio signalas nustoja veikęs, nustoja susidarinti CaM $Ca_x$  kompleksai, dėl to ir CaMKII-CaM $Ca_4$  bei CaN-CaM $Ca_4$  kompleksų susidarymas priklauso nuo kalcio signalo.

Taigi, atlikus šiuos bandymus matyti, jog tolimajame spaine vykstantys procesai yra kiek kitokie nei turėtų būti pagal teoriją. Tačiau neuronai yra sudėtingi mechanizmai, ir tokie kalcio signalai, su kuriais buvo atlikti bandymai, yra kiek nerealūs ta prasme, jog į ląstelę retai kada ateina vienas (ar du, skaičiuojant kartu su sklindančiu atgal) veikimo potencialas. Dėl to atliksime bandymus su tetaniniu signalu, kuris bus sudarytas iš penkių veikimo potencialų porų, tarpo, kai neurono neveikia jokie poveikiai, vėl penkių veikimo potencialų poravimų ir vėl tarpo.

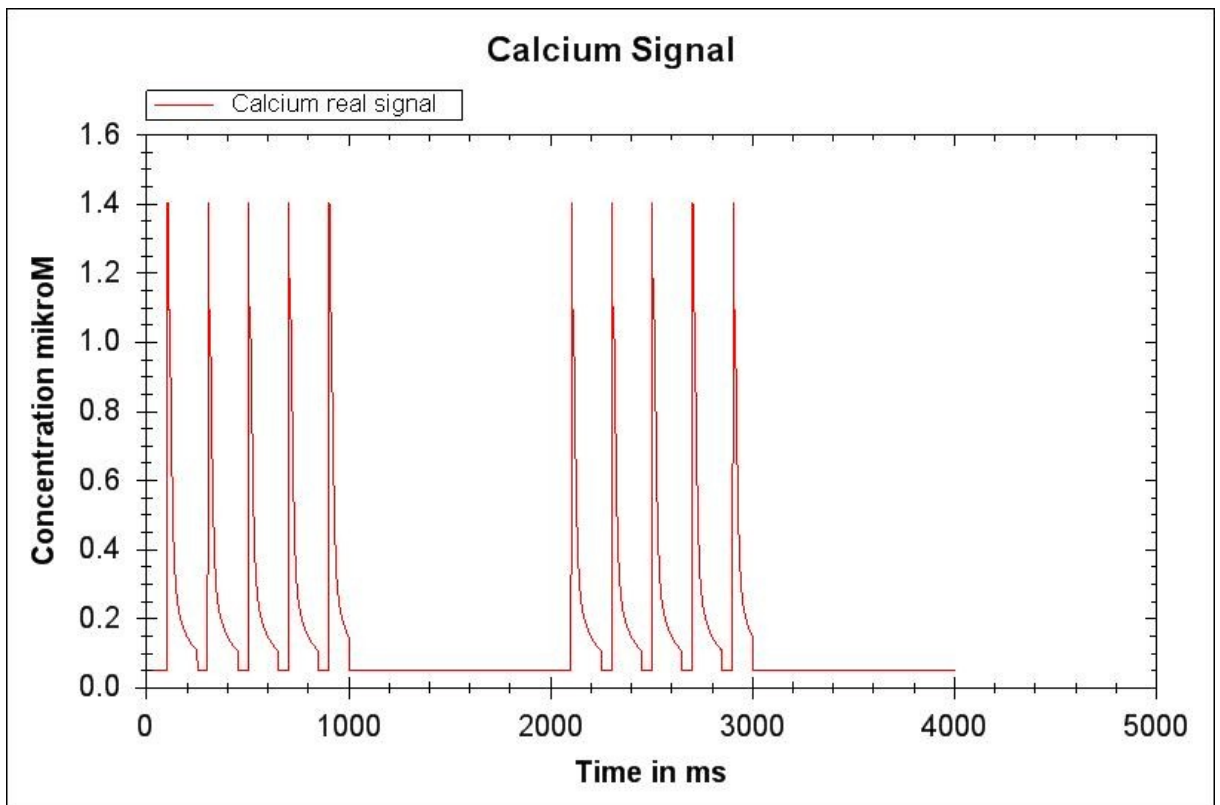
Atlikime tyrimus su šiais signalais, kai veikimo potencialų poravimas yra  $[-50; 50]$  ms ir toli nuo, ir arti somos. Reikia įsitikinti, jog procesai, vykstantys tolimajame spaine prie neigiamo veikimų potencialų poravimo, yra kiek kitokie, nei teigiama teorijoje. Kol kas toks neatitikimas buvo pastebėtas, kai  $T = -5$  ms.

Tyrimuose rasime kalcio signalo maksimumą, CaMKII visų aktyvių būsenų maksimalią reikšmę bei CaN maksimumą.

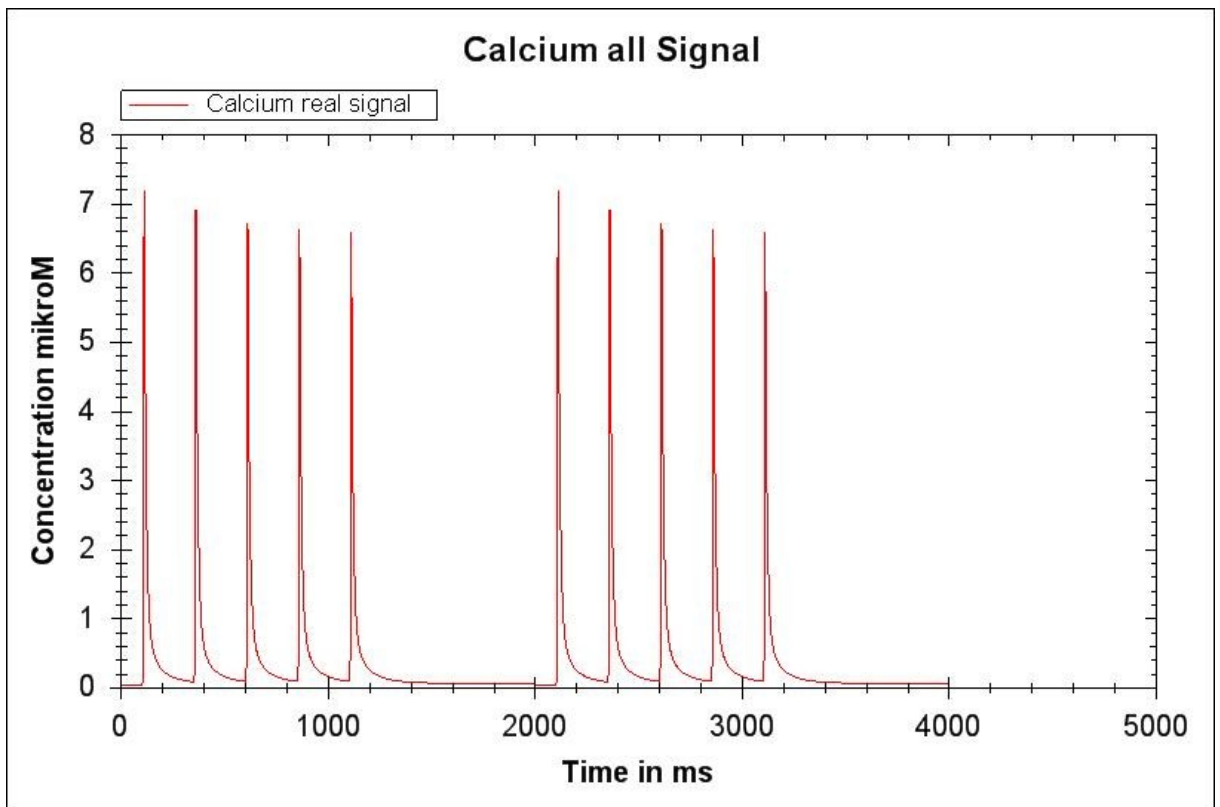
Signalų pavyzdžiai pateikti 25 – 28 paveikslėliuose.



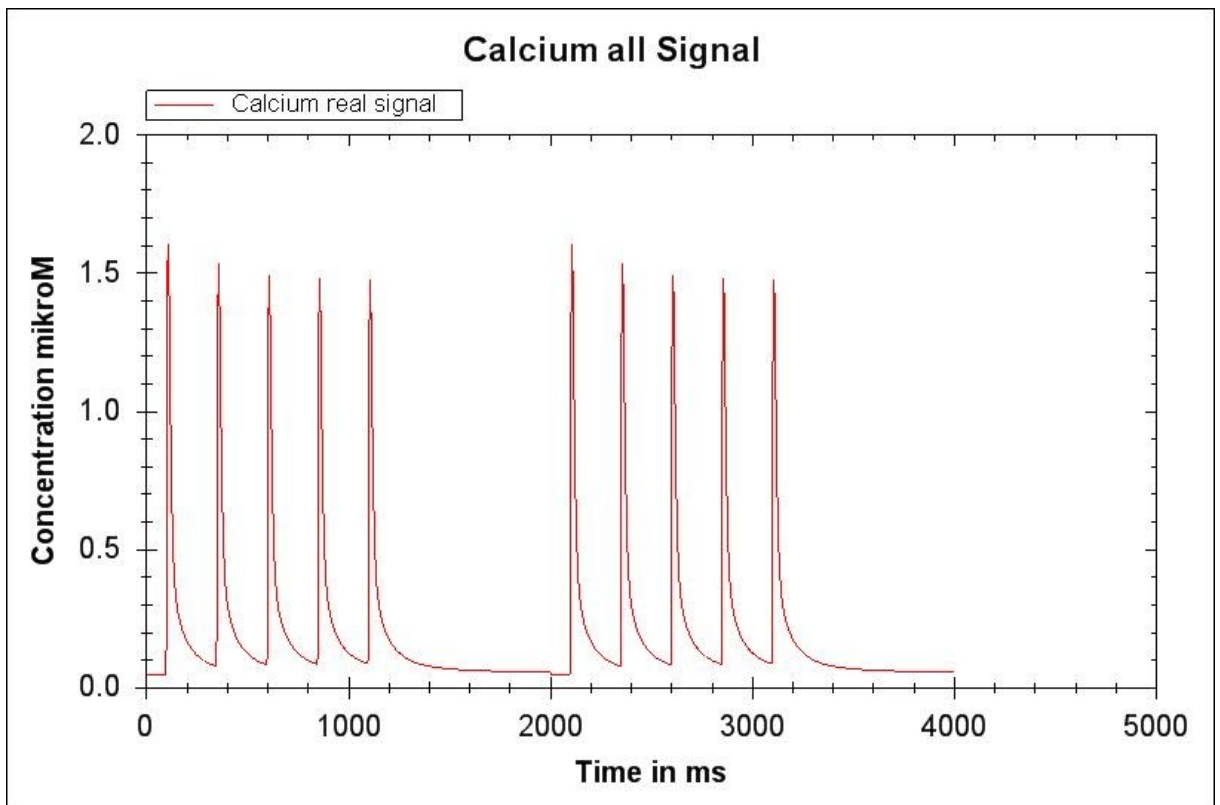
25 pav. Tetaninis kalcio signalas arti somos,  $T = 5\text{ms}$ .



26 pav. Tetaninis kalcio signalas arti somos,  $T = -5\text{ms}$ .

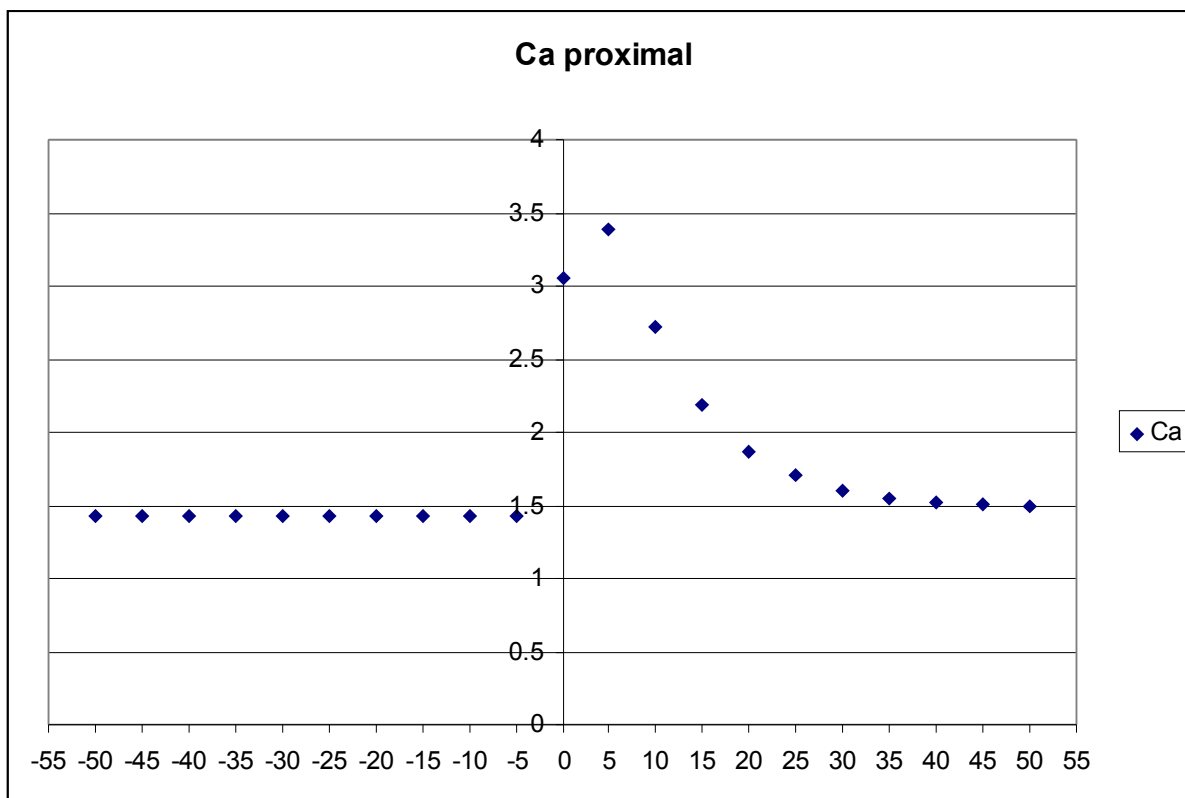


27 pav. Tetaninis kalcio signalas toli nuo somos,  $T = 5$  ms.

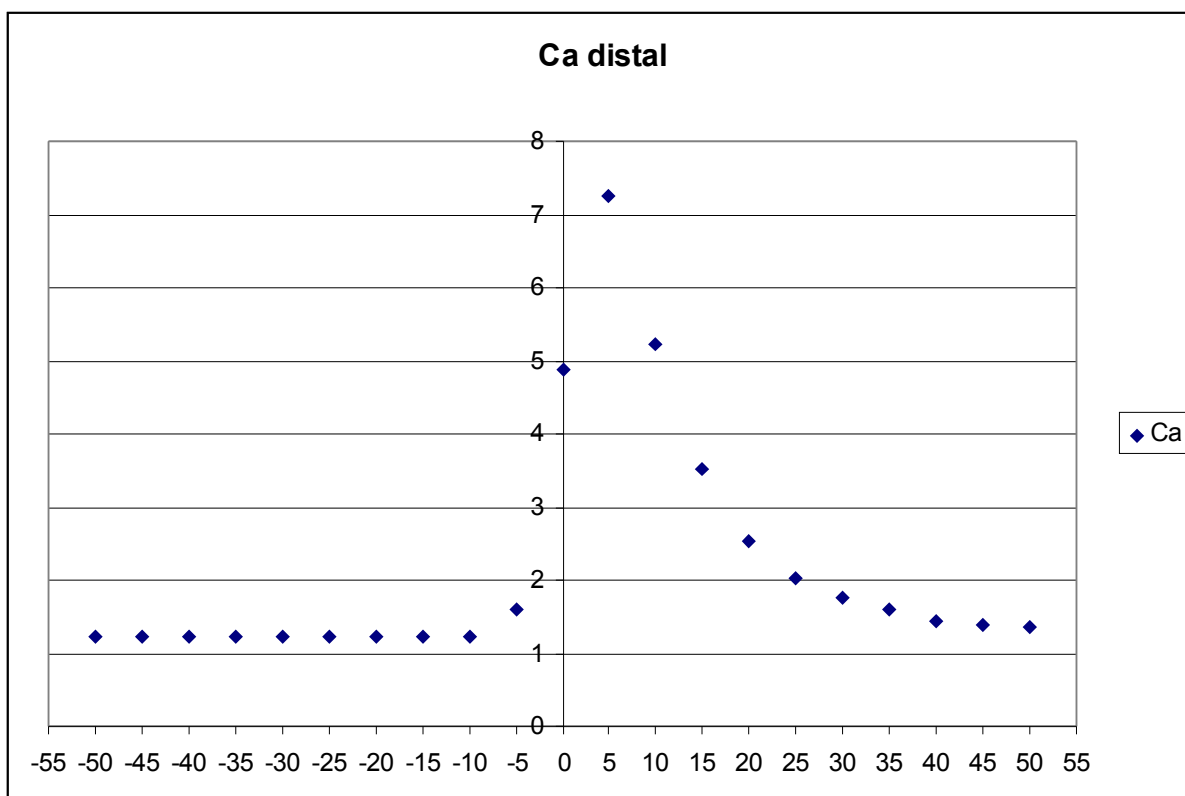


28 pav. Tetaninis kalcio signalas toli nuo somos,  $T = 5$  ms.

29 ir 30 paveikslėliuose pateikti kalcio maksimumų grafikai, atitinkantys veikimo potencialų poravimo laikus, artimajame ir tolimajame spainuose.

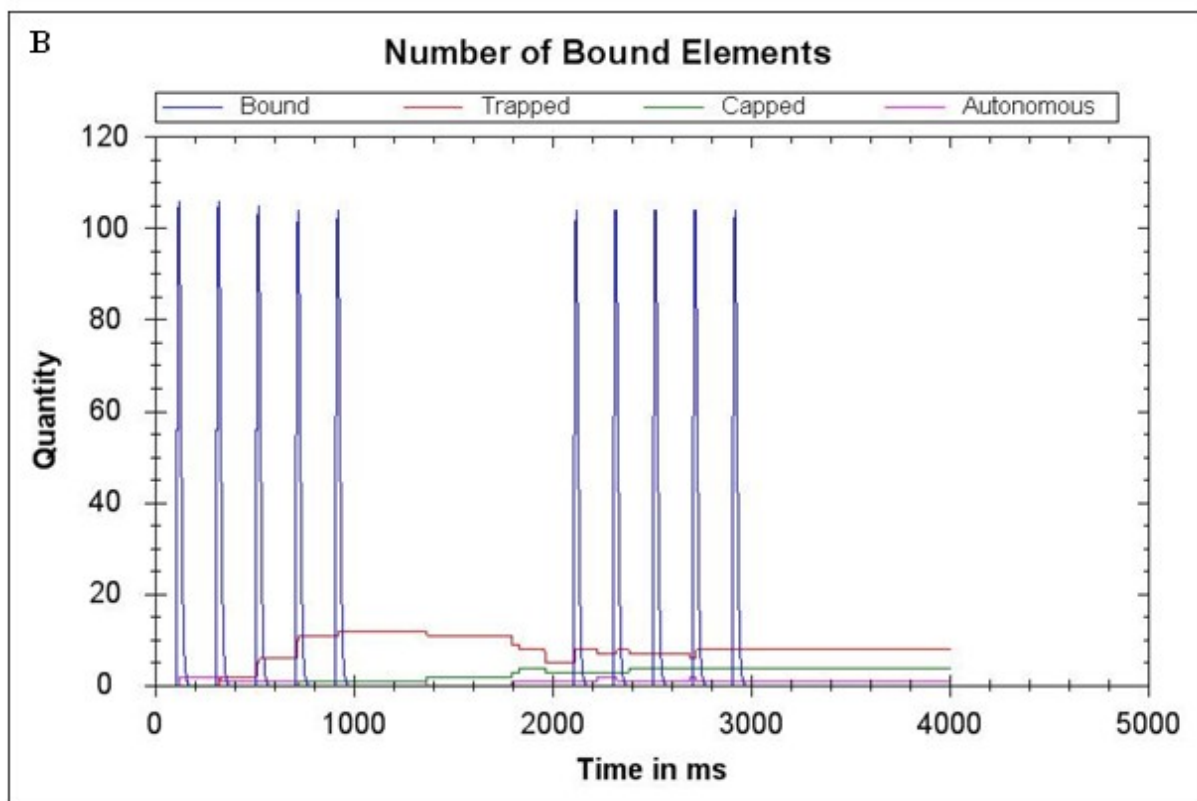
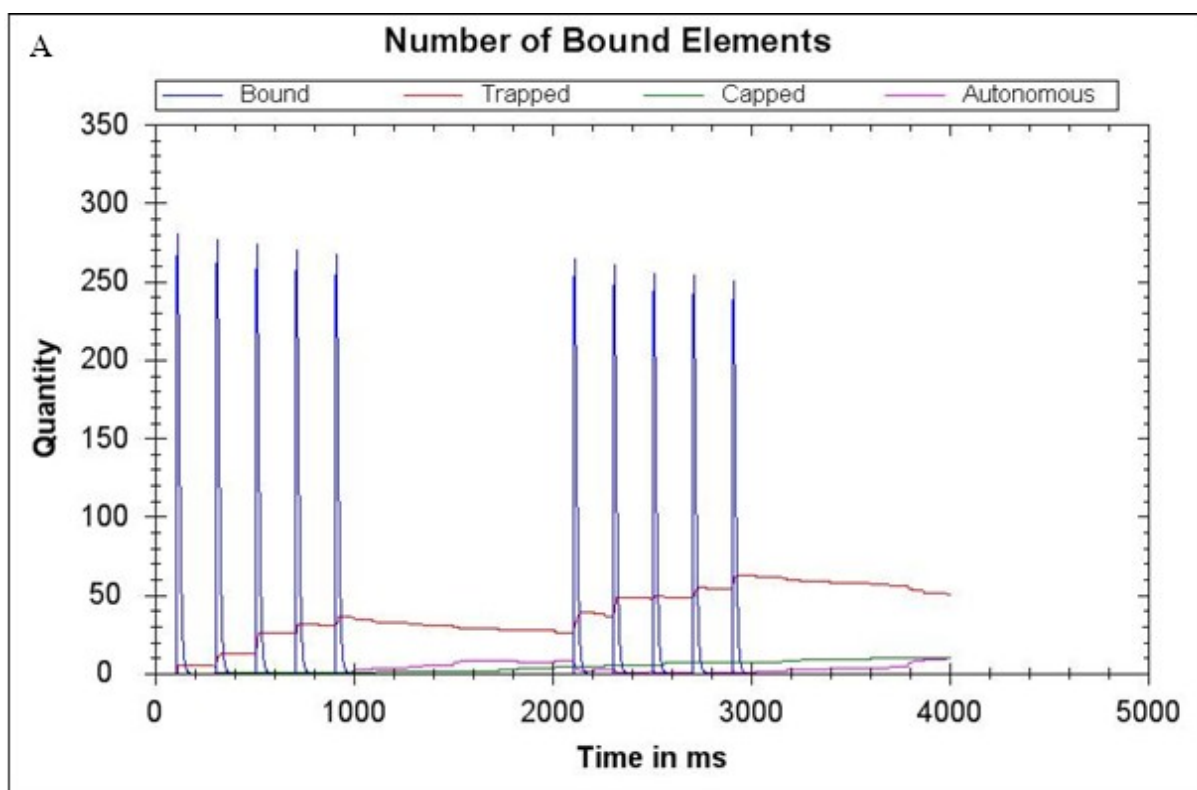


**29 pav.** Tetaninio kalcio signalo artimajame spaine maksimumai tyrimų metu.



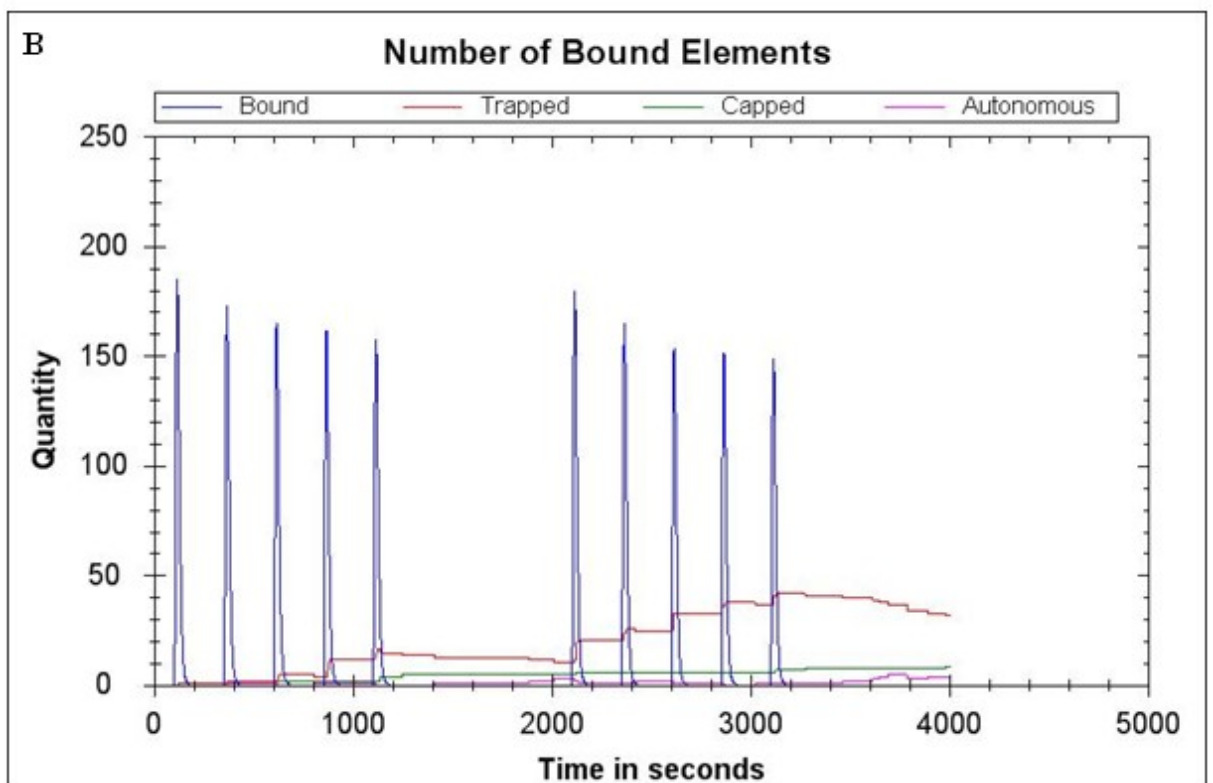
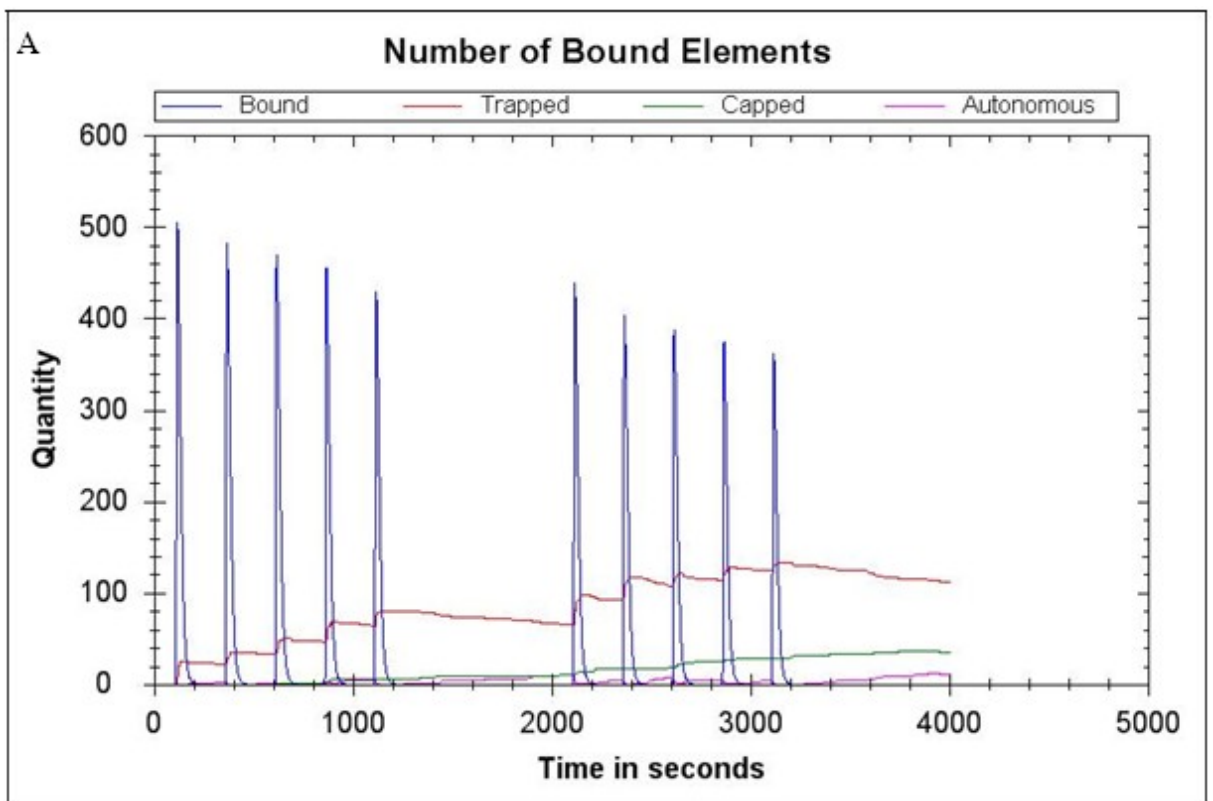
**30 pav.** Tetaninio kalcio signalo tolimajame sparne maksimumai tyrimų metu.

Atlikus eksperimentus su tetaniniais kalcio signalais, gauname CaMKII aktyvių būsenų rezultatus, pateiktus 31 ir 32 paveikslėliuose.



**31 pav.** Visų aktyvių CaMKII būsenų grafikai artimajame spaine kaip atsakas į tetaninį kalcio signalą. **A** Veikimo potencialų laiko poravimas  $T = 5$  ms. **B**  $T = -5$  ms.

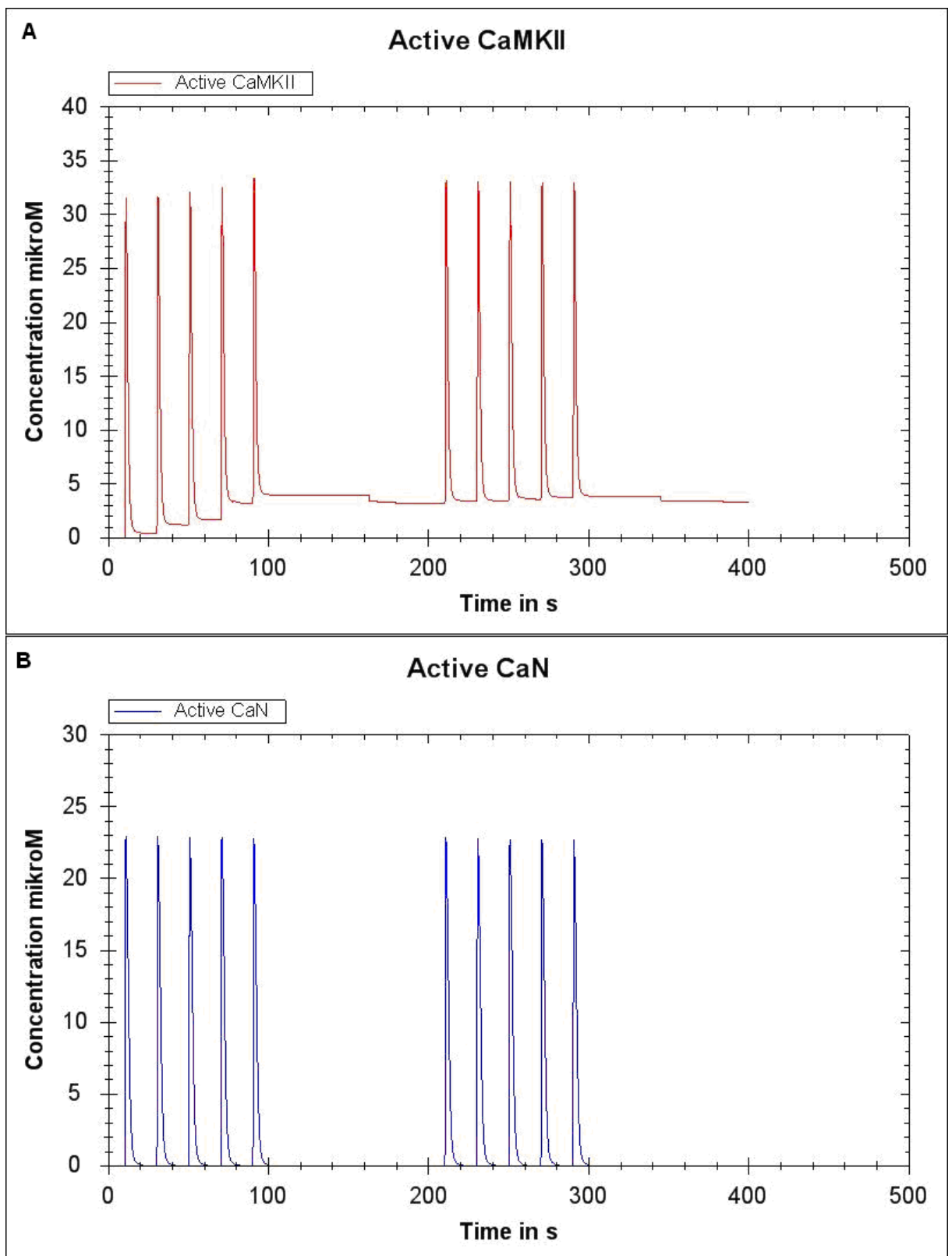




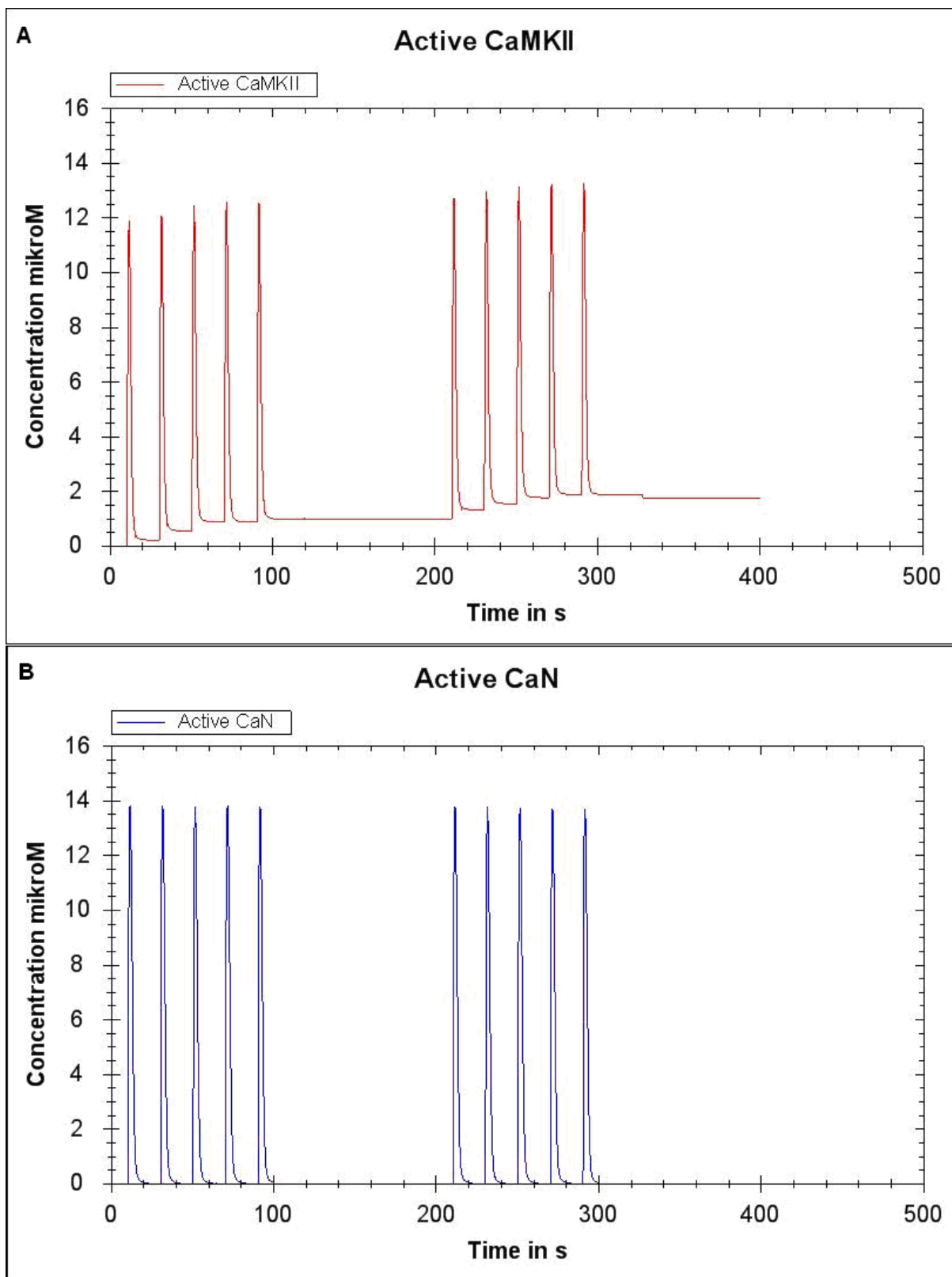
**32 pav.** Visų aktyvių CaMKII būsenų grafikai tolimajame spaine kaip atsakas į tetaninį kalcio signalą. **A** Veikimo potencialų laiko poravimas  $T = 5$  ms. **B**  $T = -5$  ms.

Lyginant kaupiančiąsias būsenas tolimajame ir artimajame spainuose prie neigiamo veikimo potencialų laikų poravimo (31-B ir 32-B pav.) galima pastebėti, jog tolimajame spaine šios aktyvios būsenos subvienetų yra gerokai daugiau nei artimajame.

Palyginkime CaMKII ir CaN koncentracijas:

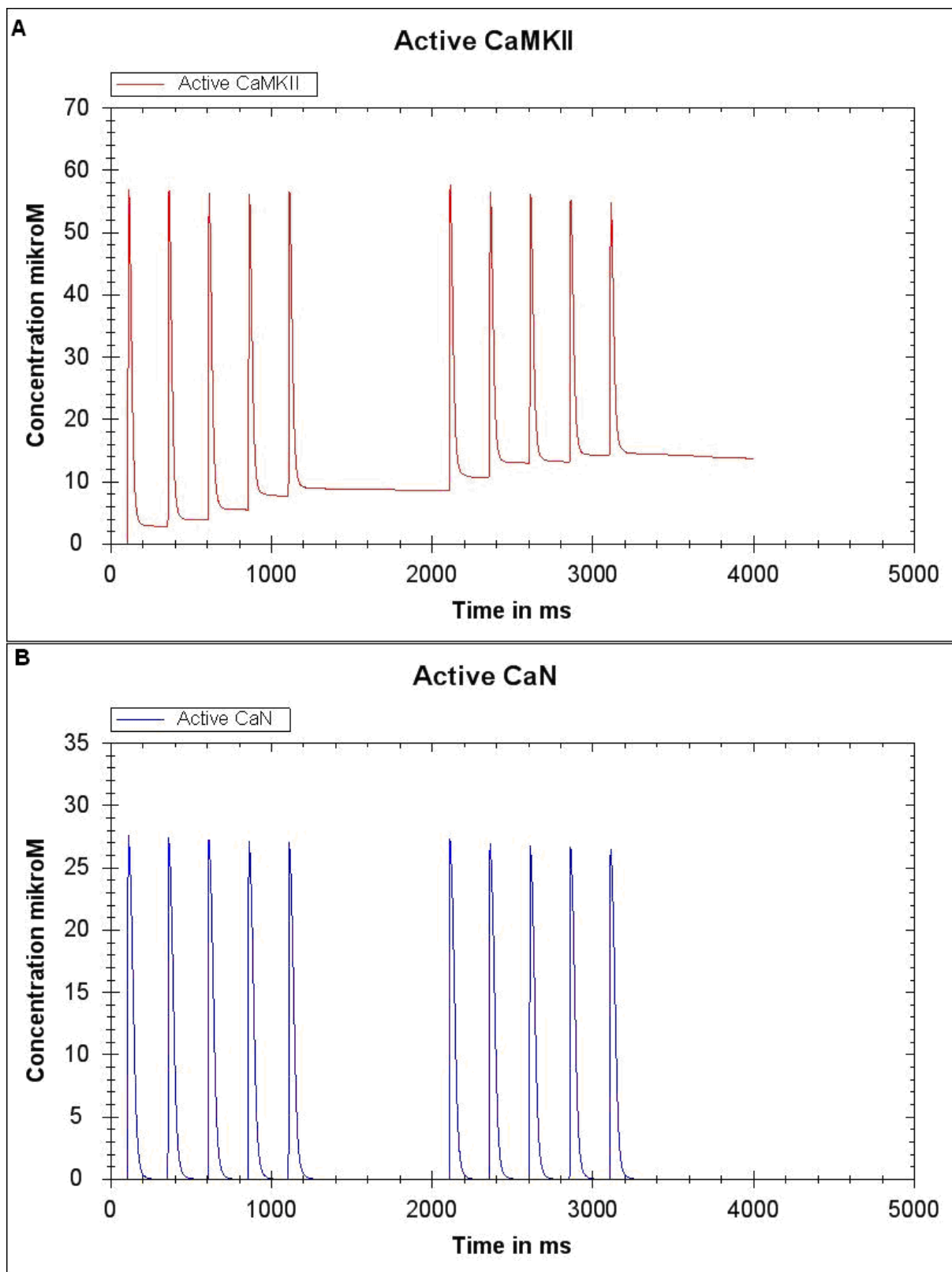


33 pav. **A** CaMKII koncentracija artimajame spaine. **B** CaN koncentracija artimajame spaine.  $T = 5$  ms.

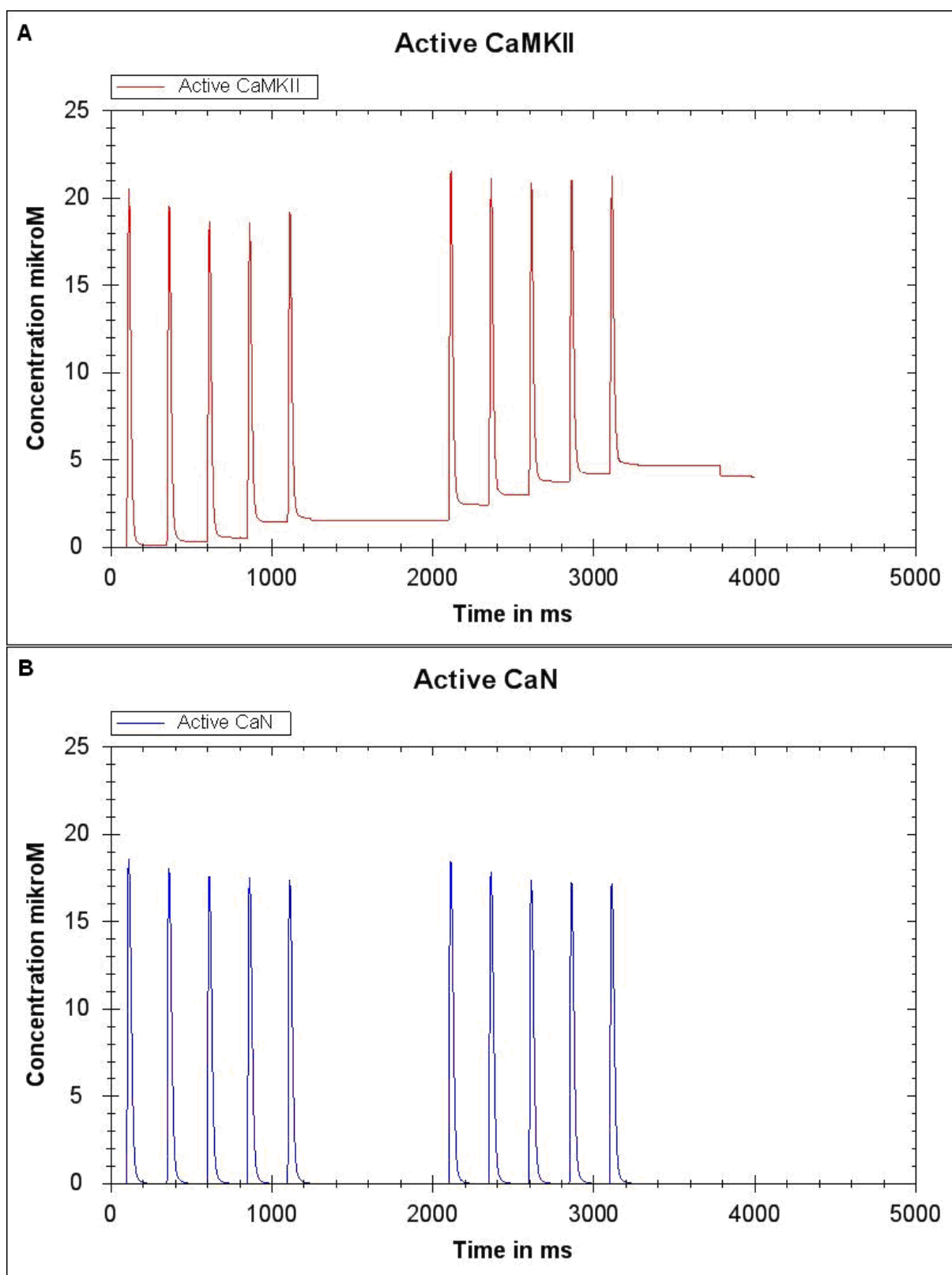


**34 pav. A** CaMKII koncentrācija artimajame spainē. **B** CaN koncentrācija artimajame spainē.  $T = -5$  ms.

Artimajame spainē divpusio plastiškuma teorija patvirināma 33 ir 34 paveikslēļais – teigiamu poravimo laiku kinazēs ir daudzi (33-A pav.), o neigiamu poravimo laiku fosfatazēs koncentrācija ir didesnē (34-B pav.).



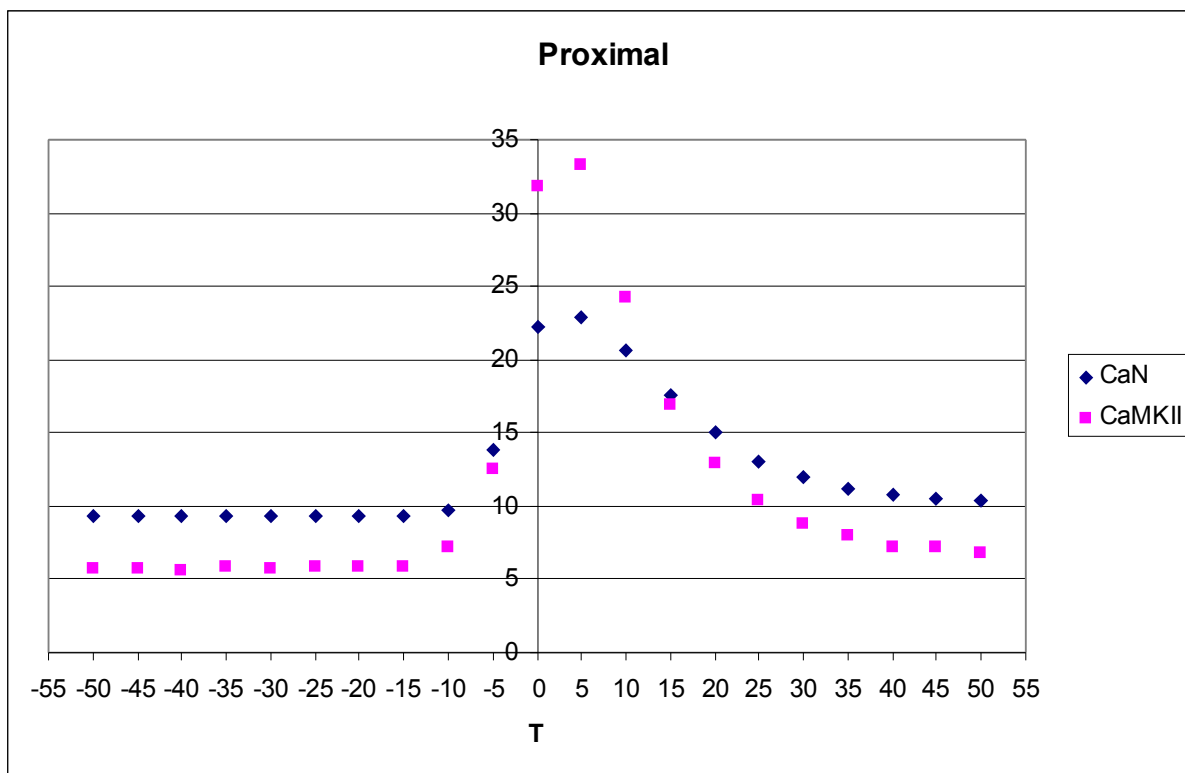
35 pav. **A** CaMKII koncentracija tolimajame spaine. **B** CaN koncentracija tolimajame spaine.  $T = 5$  ms.



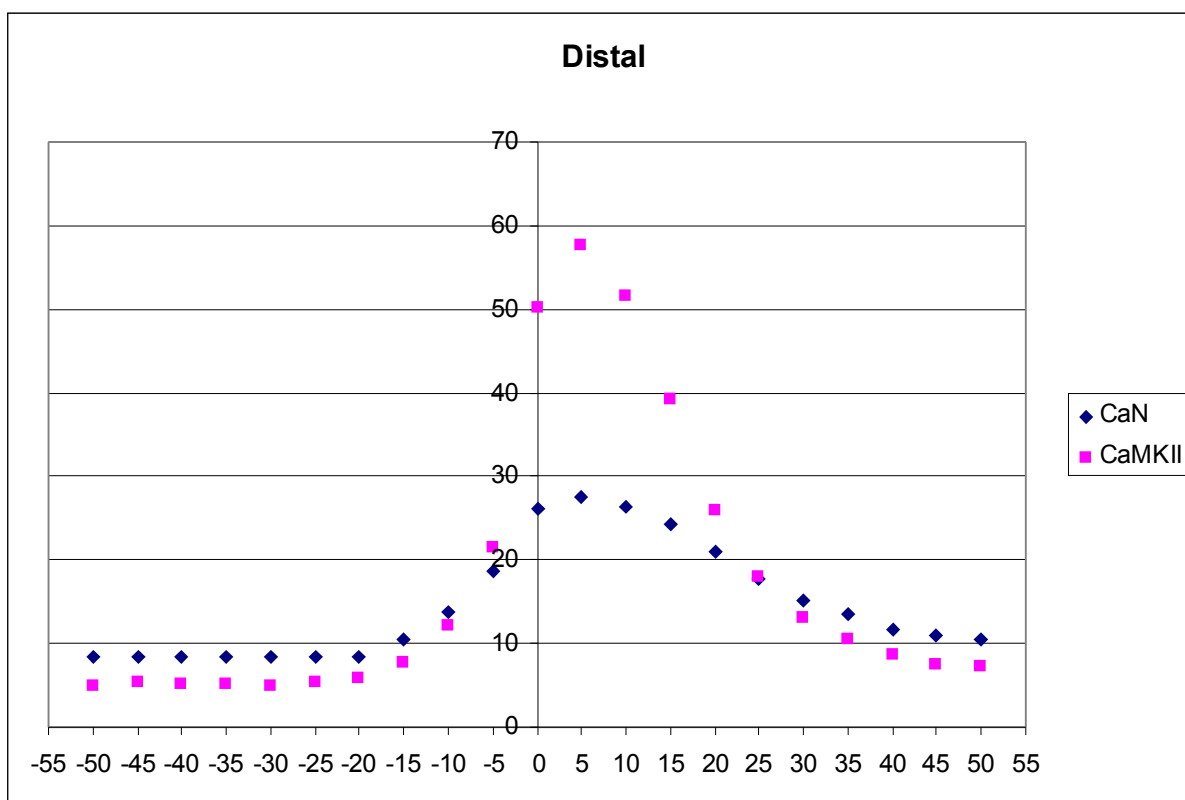
**36 pav. A** CaMKII koncentracija tolimajame spaine. **B** CaN koncentracija tolimajame spaine.  $T = -5$  ms.

Tolimajame spaine CaMKII koncentracija yra didesnė už CaN koncentraciją abiem veikimo potencialų laiko poravimo atvejais. Prie neigiamo poravimo šis skirtumas yra aiškiai matomas (36 pav.) – kitaip nei 24 paveikslėlyje, kur šis skirtumas buvo sąlyginis.

37 ir 38 paveikslėliuose pateikti CaMKII ir CaN koncentracijų maksimumų grafikai.



37 pav. CaMKII ir CaN maksimumai artimajame spaine.



38 pav. CaMKII ir CaN maksimumai tolimajame spaine.

Taigi pagal koncentracijų maksimumus matyti, jog tolimasis spainas elgiasi kiek kitaip nei artimasis. Ir netgi esant neigiamam laiko poravimui, tolimajame spaine galima sukelti ilgalaikę potenciaciją.

Atlikime po kelis eksperimentus laiko poravimo momentais  $T = -5$  ms ir  $T = 5$  ms ir arti, ir toli nuo somos. Palyginsime aktyvių CaMKII subvienetų kiekius. Rezultatai pateikti 1 lentelėje. Aktyvių būsenų reikšmės pateiktos vienetais, o CaMKII ir CaN –  $\mu\text{M}$ .

**Lentelė 1**

	T	Susijungusi	Kaupiančioji	Autonominė	CaMKII	CaN
Tolimasis	5	500-520	120-140	20-25	~60	~28
	-5	180-190	25-40	5-10	22-24	18-19
Artimasis	5	280-290	30-50	5-10	30-35	23-24
	-5	112-115	10-30	0-5	12-14	~14

Palyginkime pirmoje lentelėje pateiktas CaMKII aktyvių būsenų subvienetų reikšmes. Ilgai išliekančios – kaupiančioji ir autonominė – būsenos tolimajame spaine prie  $T = -5$  ms ir artimajame spaine prie  $T = 5$  ms yra persiklojančios. Kadangi artimajame spaine stebima ilgalaikė potenciacija, tai tolimajame spaine su panašiomis aktyvių būsenų subvienetų reikšmėmis tikriausiai taip pat galima stebėti ilgalaikę potenciaciją.

## 6. Išvados

Dvipusio sinapsinio plastiškumo modelių įvairovė leidžia ištirti šio mechanizmo ypatybes. Tačiau, kiekvienas iš šių modelių stokoja tam tikrų detalių. Šiame biologinių neuronų mokymosi savybių tyrime naudotas Holmso nuo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  priklausančios kinazės (CaMKII) aktyvacijos modelis, kuriuo norėta ištirti kinazės ir fosfatazės konkurenciją ilgalaikės potenciacijos ir/arba ilgalaikės depresijos atžvilgiu.

Išnagrinėjus kelis straipsniuose pateiktus dvipusio sinapsinio plastiškumo modelius, buvo nuspręsta išnagrinėti du – d'Alcantaros ir Holmso modelius. Šie modeliai, nors abu yra apie sinapsinį plastiškumą, skiriasi iš esmės. Viename ilgalaikiai procesai sukeliama ir stebimi sinapsiniuose receptoriuose (d'Alcantaros modelyje), kitame stebima enzimų konkurencija leidžiant įvairius kalcio jonų signalus (Holmso modelis). Detaliam nagrinėjimui pasirinktas Holmso modelis dėl vienos labai svarbios priežasties – šis modelis jautrus kalcio signalams, kurie stebimi ir realiuose fiziologiniuose sinapsių plastiškumo tyrimo eksperimentuose. Tuo tarpu d'Alcantaros modelyje naudojami dirbtiniai kalcio signalai, kurių forma viso eksperimento metu nesikeičia. Tokie signalai yra dirbtiniai, nestebimi fiziologiniuose eksperimentuose. Kalcio jonų signalo dinamika turi labai didelės įtakos mokymosi procesui ir ilgalaikės atminties atsiradimui.

Kiekvienas iš minėtų straipsnių turi ir savų trūkumų modelio sudarymo atžvilgiu. Holmso straipsnyje pateikta detali  $\text{CaM}\text{Ca}_x$  susidarymo eiga ir šio komplekso jungimasis prie CaMKII ir CaN, ko nėra d'Alcantaros modelyje. Tačiau Holmso modelyje nėra svarbaus fakto, kad slopinamasis ilgalaikių procesų sukėlimo kelias turi įtakos žadinančiajam. Taip pat Holmso straipsnyje nėra AMPA receptorių veikimo šakos, pagal kurią d'Alcantaros straipsnyje nustatoma, koks ilgalaikis procesas vyksta sinapsėje. Idealiu atveju būtų galima apjungti šiuos du modelius, sudarant vieną taip, kad modeliai papildytų vienas kitą ir pašalintų trūkumus. Tačiau reikia būti atsargiems, kadangi modeliai būna kuriami atsižvelgiant į skirtingas biofizikines sąlygas. Kyla modelių suderinamumo klausimas.

Atlikus eksperimentus (naudojantis Holmso modeliu) su realiais kalcio signalais arti ir toli nuo somos esančiuose spainuose buvo patvirtinta hipotezė, kad dvipusis sinapsinis plastiškumas priklauso ne tik nuo veikimo potencialų poravimo laikų, bet ir nuo sinapsės vietos neurone. Kadangi teigiama, jog ilgalaikė depresija stebima tada, kai veikimo potencialų poravimas yra neigiamas (postsinapsinis veikimo potencialas lenkia presinapsinį), eksperimentų metu galima buvo tikėtis tolimajame spaine prie laiko poravimo  $T = -5$  ms stebėti ilgalaikę depresiją. Tačiau rezultatai parodė ką kitą.



Kinazių ir fosfatazių konkurencija ilgalaikės depresijos atveju turėtų būti „laimėta“ fosfatazės. T.y. fosfatazės(ių) koncentracija sinapsėje turėtų viršyti kinazės koncentraciją. Tačiau tolimajame spaine, kai veikimo potencialų laiko poravimas buvo  $T = -5$  ms, kinazės koncentracija pastebimai viršijo fosfatazės koncentraciją.

Lyginant šio eksperimento rezultatus su eksperimentu, atliktu arti somos esančiame spaine, kai  $T = 5$  ms, galima pastebėti, jog aktyvių CaMKII būsenų subvienetų, ypač ilgai išliekančių kaupiančiosios ir autonominės, skaičiai buvo panašūs, persiklojantys. Kadangi artimajame spaine esant tokiems CaMKII aktyvių subvienetų kiekiams buvo stebima ilgalaikė potenciacija, galima daryti prielaidą, jog ir tolimajame spaine vyksta ilgalaikė potenciacija, nors laiko poravimo atžvilgiu turėtų vykti ilgalaikė depresija.

Tokius rezultatus galima paaiškinti CaMKII autoreguliacine savybe. Kadangi net ir pasibaigus kalcio signalui CaMKII išlieka autofosforilinama, tai gali turėti įtakos ilgalaikiams procesams. Tuo tarpu CaN neturi tokių ilgalaikių savybių kaip CaMKII – kalcineurino kinetika yra ganėtinai greita ir ši fosfatazė neakumuliuoja aktyvių proteinų.

Taigi kaip įsitikinta, dvipusis sinapsinis plastiškumas priklauso ne tik nuo veikimo potencialų poravimo, bet ir nuo vietos, kurioje vyksta plastiškumas.

Vis dėl to, šie tyrimai atlikti modeliuojant procesus neuronuose. Norint įsitikinti šių prielaidų teisingumu reikia atlikti realius bandymus. Žinoma, eksperimentų metu reikėtų rinktis tas smegenų sritis, kurioms ilgalaikė potenciacija ir ilgalaikė depresija yra reikšmingi procesai.

## 7. Naudota literatūra

Bhalla, U. S., Vasudeva, K. Adaptive stochastic-deterministic chemical kinetic simulations. *Bioinformatics*, vol. 20, No. 1, 78-84 (2004).

Bi, G.-Q., Rubin, J. Timing in synaptic plasticity: from detection to integration. *Trends in Neurosciences* Vol. 28, No.5 , 222-228. (2005)

Cavazzini, M., Bliss, T., Emptage, N.  $\text{Ca}^{2+}$  and Synaptic Plasticity. *Cell Calcium* Vol 38, Issue 3-4, 355-367. (2005)

d'Alcantara, P., Schiffmann, S., Swillens, S. Bidirectional synaptic plasticity as a consequence of interdependent  $\text{Ca}^{2+}$ -controlled phosphorylation and dephosphorylation pathways. *European Journal of Neuroscience*, vol. 17, 2521-2528. (2003)

Holmes, W.R. Models of calmodulin trapping and CaM kinase II activation in a dendritic spine. *Journal of Computational Neuroscience* 8, 65-85. (2000)

Hudmon, A., Schulman, H. Structure-function of the  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *Biochem. J.* 364, 593-611. (2002)

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. *Principles of neural science*. Fourth Editon. 2000. 1414 p.

Koch, Ch. *Biophysics of Computation*. Oxford. 1999. 562 p.

Letzkus, J. J., Kampa, B. M., Stuart, G. J. Learning Rules for Spike Timing-Dependent Plasticity Depend on Dendritic Synapse location. *Journal of Neuroscience* 26(41), 10420-10429. (2006)

Lisman J., Malenka R.C., Nicoll R.A., Malinow R. Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science* 276:2001-2002. (1997)

Poirazi, P., Brannon, T., Mel, B.W. Arithmetic of subthreshold synaptic summation in a model CA1 pyramidal cell. *Neuron* 37:977-987 (2003)

Svirskis, G. *Neurotransdukcija*. V.: Vilniaus universitetas, 2007. 200 p.

## Research of biological neurons learning characteristics

### Summary

Previous studies focusing on the temporal rules governing changes in synaptic efficacy during spike timing-dependent plasticity (STDP) have paid little attention to spatial characteristics of neurons. We analyze the activity of calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) and phosphatase calcineurin (CaN) in proximal and distal spines and their impact on long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). During tests we found that at negative timing of action potentials in distal spine synapse can undergo LTP while in proximal spine the processes follow the classic STDP rules. Our results suggest that synapse location within the dendritic tree is a crucial determinant of STDP.

## 8. Santrumpų žodynas

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilsoksazolio-4-propioninė rūgštis;

$\text{Ca}^{2+}$  – kalcio jonai;

CaM – kalmodulinas;

$\text{CaM}\text{Ca}_4$  – kalmodulino su keturiais kalcio jonais kompleksas;

CaMKII – nuo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM priklausanti kinazė II;

CaN – kalcineurinas;

GABA –  $\alpha$ -aminobutirinė rūgštis;

NMDA – N-metil-D-aspartato rūgštis.

## 9. Priedai

### 9.1. Konferencijos ir apdovanojimai

2007 metais sausio 31 dieną konferencijoje „Informacinės technologijos 2007“ temoje „Informatika sveikatos apsaugai“ buvo skaitytas pranešimas „Biologinių neuronų mokymosi savybių tyrimas“, kuriame buvo pristatyta pradinė tyrimo medžiaga, tyrinėjimo tikslas – sinapsinio plastiškumo savybės sinapsėse, uždaviniai – pritaikyti kinetinius modelius sinapsiniam plastiškumui ištirti, bei taikytini metodai ir modeliai.

2008 metais gegužės mėnesį užsiregistruota į konferenciją „Minischool and Workshop on Multiple Time Scale in the Dynamics of the Nervous System“, kuri vyks 2008 metais gegužės 16-20 dienomis Trieste mieste Italijoje. Šiai konferencijai pateikta darbo santrauka prisegama 9.2 skyriuje Konferencijų medžiaga. Šiame pranešime analizuojami gauti rezultatai – sinapsinio plastiškumo savybių priklausomybė nuo sinapsių vietos dendritiniame medyje.

2008 metais vasario 21 dieną gauta premija iš bendrovės „Philip Morris Baltic“ įsteigta paramos studentams programos Laurus, kurios tikslas – skatinti ir remti magistrantūros studijų studentus, siekiančius, kad jų kursinis ar baigiamasis darbas būtų ne tik teorinio pobūdžio, bet turėtų ir kuo didesnę praktinę vertę.

### 9.2. Konferencijų medžiaga

Prisegama konferencijai „Minischool and Workshop on Multiple Time Scale in the Dynamics of the Nervous System“ pateikta santrauka.

Activity of signaling molecules underlying STDP is location dependent in a model CA1 pyramidal neuron

Aušra Saudargienė<sup>1</sup>, Giedrė Slivko<sup>2</sup>, Arnd Roth<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania

<sup>2</sup>Kaunas University of Technology, Lithuania

<sup>3</sup>Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London, London, UK

Spike-timing-dependent plasticity (STDP) is a form of bidirectional change in synaptic strength that depends on the temporal order and temporal difference of the pre- and postsynaptic activity (Song et al., 2000). The synapse undergoes long-term potentiation (LTP) if the presynaptic spike precedes the postsynaptic spike, and exhibits long-term depression

(LTD) if the temporal order is reversed. Recent physiological observations suggest that the form of plasticity at a synapse depends not only on the timing of the pre- and postsynaptic activity but also on the location of the synapse on the dendritic tree (Golding et al., 2002; Sjöström et al., 2006; Letzkus et al., 2006; for review see Sjöström et al., 2008). Numerous modelling studies investigate molecular mechanisms of synaptic plasticity (e.g. Graupner and Brunel, 2007; d'Alcantara et al., 2003; Zhabotinsky, 2000). However, the influence of the dendritic location of the synapse on the plasticity mechanisms has not been addressed in detailed models of STDP.

We analyse the activity of the calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) and the phosphatase calcineurin at proximal and distal spines of a model CA1 pyramidal neuron. It is known that calcium-activated CaMKII and calcineurin may cause phosphorylation or dephosphorylation of AMPA-type glutamate receptors, and these changes in AMPAR phosphorylation state are thought to underlie LTP and LTD (Lisman et al., 1997). We model the trigger of these second messenger cascades, the calcium signal, by pairing the AMPA and NMDA receptor activation with a backpropagating action potential at a spine close to the soma and by pairing the AMPA and NMDA receptor activation with a dendritic spike at a spine in distal dendritic regions. We employ a detailed compartmental model of CA1 cell (Poirazi et al., 2003) and adjust the calcium handling mechanism following Sabatini et al., 2002. The resulting calcium signals are used in a realistic model of CaMKII and calcineurin activation and interaction (Holmes, 2000). Phosphorylation of the CaMKII subunits and activation of calcineurin is fast, while autophosphorylation of CaMKII subunits occurs at a much slower time scale.

We show that the activity of CaMKII is higher than the activity of calcineurin for the multiple pre-post spike pairing and lower if the temporal order is reversed in a proximal spine. These results are consistent with the rules for LTP/LTD induction observed experimentally. However, CaMKII exhibits higher activity than calcineurin for both cases in a distal spine and implies that synapses in distal dendritic regions tend to undergo LTP neglecting the temporal order of the pre- and local postsynaptic events. In multiple spike pairings, a high CaMKII activation level is maintained through the slow autophosphorylation process of CaMKII subunits, while calcineurin kinetics is relatively fast and does not lead to accumulation of the activated protein. Although the peak calcium concentration is similar in the proximal and distal spines for the post-pre protocol, the different CaMKII and calcineurin activity levels suggest that the time course of calcium concentration might play an important role in synaptic plasticity.

## References

- d'Alcantara, P., Schiffmann, S., Swillens, S. (2003). Bidirectional synaptic plasticity as a consequence of interdependent Ca<sup>2+</sup>-controlled phosphorylation and dephosphorylation pathways. *European Journal of Neuroscience*, vol. 17, 2521-2528.
- Graupner, M., Brunel, N. (2007). STDP in a Bistable Synapse Model Based on CaMKII and Associated Signaling Pathways. *PLoS Computational Biology*, vol. 3, 2299-2323.
- Golding, N. L., Staff, P. N., and Spruston, N. (2002). Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation. *Nature* vol. 418(6895), 326-331
- Holmes, W.R. (2000). Models of calmodulin trapping and CaM kinase II activation in a dendritic spine. *Journal of Computational Neuroscience* 8, 65-85.
- Letzkus, J. J., Kampa, B. M., Stuart, G. J. (2006) Learning Rules for Spike Timing-Dependent Plasticity Depend on Dendritic Synapse location. *Journal of Neuroscience* 26(41), 10420-10429.
- Poirazi, P., Brannon, T., Mel, B.W. (2003). Online Supplement: About the Model Neuron 37 Online:1-20
- Sabatini, B., Oertner, T., Svoboda, K. (2002). The Life Cycle of Ca<sup>2+</sup> Ions in Dendritic Spines. *Neuron* 33, 439-452.
- Song S., Miller, D., Abbot, L.F.(2000) Competitive Hebbian Learning through Spike-Timing-Dependent Synaptic Plasticity. *Nat. Neurosci.* 3, 919-926
- Sjöström J., Häusser, M. (2006) A Cooperative Switch Determines the Sign of Synaptic Plasticity in Distal Dendrites of Neocortical Pyramidal Neurons. *Neuron* 51, 227-238 (2006).
- Sjöström, J., Rancz EA., Roth, A., Häusser, M. (2008). Dendritic Excitability and Synaptic Plasticity. *Physiol Rev.* 88, 769-840 (2008)
- Zhabotinsky, A. (2000). Bistability in the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-phosphatase system. *Biophysical Journal* 79(5), 2211-2221.