

mgr Anna Cały

**Wpływ procesu starzenia
na neuronalne mechanizmy decyzji przestrzennych**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania

Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Katarzyna Radwańska

Warszawa, 2021

Podziękowania

Serdecznie dziękuję mojej promotor prof. dr hab. Katarzynie Radwańskiej za możliwość zdobycia doświadczenia i rozwoju naukowego oraz codzienną wyrozumiałość i cierpliwość.

Bardzo dziękuję wszystkim członkom Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania i innym koleżankom i kolegom z Instytutu z którymi miałam przyjemność współpracować. Dziękuję Wam za okazaną życzliwość i miłą atmosferę.

Szczególne podziękowania kieruję do Magdy Ziółkowskiej, Gosi Borczyk, Kacpra Łukasiewicza, Magdy Robachy, Gosi Śliwińskiej, Kamila Tomaszewskiego, Gabrysi Olech-Kochańczyk i Karoliny Hajdukiewicz za wsparcie, niezapomniane chwile i za godziny dyskusji naukowych i nie tylko....

Nade wszystko dziękuję:

Moim Rodzicom za nieustanną pomoc i motywację,

Mojemu Mężowi Sebastianowi za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość,

Mojemu Synkowi Jasiowi za to, że dał mi siłę

i wszystkim, którzy zawsze mnie wspierali.

Spis treści

Streszczenie.....	5
Abstract.....	7
Wykaz stosowanych skrótów	8
1. Wstęp.....	10
1.1. Hipokamp	10
1.2. Plastyczność synaptyczna	14
1.3. Strukturalne komponenty synaps pobudzających	15
1.4. Plastyczność funkcjonalna	19
1.5. Molekularne podłoże plastyczności synaptycznej w synapsach glutaminianergicznych	20
1.5.1. Receptory jonotropowe glutaminianu: AMPAR i NMDAR.....	21
1.5.2. Białka rusztowania synaptycznego: MAGUK.....	22
1.5.2.1. Modyfikacje potranslacyjne PSD-95	23
1.5.2.2. Zaburzenia poziomu ekspresji PSD-95 i jego skutki	27
1.6. Zmiany strukturalne i funkcjonalne związane z procesem starzenia	29
1.6.1. Pogorszenie zdolności poznawczych i pamięci przestrzennej	30
1.6.2. Wpływ procesu starzenia na anatomię hipokampa	31
1.6.3. Zmiany w neuronalnej plastyczności funkcjonalnej.....	32
1.6.3.1. Wpływ procesu starzenia na strukturę i funkcję receptorów NMDA	32
1.6.3.2. Zaburzenia w poziomie PSD-95 w starzejących się neuronach hipokampa.....	34
2. Cele pracy.....	36
3. Materiały i metody.....	37
3.1. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach	37
3.2. Test preferencji/unikania miejsca w klatkach IntelliCage	39
3.2.1. System IntelliCage.....	39
3.2.2. Trening w klatce IntelliCage	40
3.3. Perfuzja przezsercowa.....	42
3.4. Barwienie immunofluorescencyjne.....	42
3.5. Stereotaktyczne iniekcje wektorów wirusowych	43
3.6. Obrazowanie i analiza zdjęć mikroskopowych.....	45
3.7. Analiza statystyczna	46
4. Wyniki	47
4.1. Trening wyboru przestrzennego u młodych i starych myszy	47

4.2. Wpływ interakcji społecznych na dokonywanie wyborów przestrzennych u starych myszy	51
4.3. Trening wyborów przestrzennych i wiek wpływają na plastyczność kolców dendrytycznych	55
4.4. Starzenie się wpływa na korelację pomiędzy poziomem białka synaptycznego PSD-95 a wielkością kolca dendrytycznego	59
4.5. Wybór przestrzenny i trening nieprzestrzenny wywołują powstawanie różnych wzorców plastyczności synaptycznej.....	63
4.6. Rola PSD-95 w regionie dCA1 w dokonywaniu wyboru przestrzennego u młodych myszy	67
4.7. Rola seryny 73 PSD-95 w dokonywaniu wyboru przestrzennego u młodych myszy	71
4.8. Funkcja PSD-95 w regionie dCA1 w dokonywaniu wyboru przestrzennego u starzejących się samic myszy	75
5. Dyskusja	79
5.1. Plastyczność neuronalna w dCA1 wpływa na dokonywanie wyborów przestrzennych	79
5.2. Interakcje społeczne i zachowanie innych zwierząt w populacji wpływają na wybór przestrzenny starzejących się osobników	81
5.3. Zmiany synaptyczne w dCA1 u młodych i starych myszy	83
6. Podsumowanie i wnioski.....	86
7. Bibliografia	87
8. Suplement	110
8.1. Makro do analizy kolokalizacji kolców dendrytycznych i PSD-95	110
8.2. Makro do analizy poziomu białka	113
8.3. Dorobek doktorantki.....	115

Streszczenie

Plastyczność synaps glutaminianergicznych grzbietowej części pola CA1 (dCA1) hipokampa uważana jest za neuronalne podłoże procesów poznawczych angażujących informację przestrzenną. Ze względu na upośledzone działanie hipokampa u starszych osobników, wciąż pozostaje niewyjaśnione w jaki sposób starsze zwierzęta i ludzie w podeszłym wieku dokonują wyborów przestrzennych, czyli takich, w których wykorzystują informację przestrzenną do rozróżnienia identycznych obiektów znajdujących się w różnych lokalizacjach. W niniejszej dysertacji wykorzystałam klatkę IntelliCage do badania procesów behawioralnych, które wspierają wybory przestrzenne starszych samic myszy żyjących w grupie. Miarą zachodzącej plastyczności synaptycznej indukowanej w czasie treningu były zmiany morfologii kolców dendrytycznych i ekspresji jednego z najliczniej występujących białek rusztowania synapsy glutaminianergicznej, PSD-95 (ang. *postsynaptic density protein 95*; białko zagęszczenia postsynaptycznego 95). Białko PSD-95 reguluje funkcje synaps, a obniżenie jego poziomu zaburza transmisję poprzez receptory AMPA (aktywowane przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy) i NMDA (aktywowane przez kwas N-metylo-D-asparaginowy) dla glutaminianu.

Zaobserwowałam, że trening wyboru przestrzennego indukował skorelowane kurczenie się kolców dendrytycznych i obniżenie poziomu białka PSD-95 w dCA1 u młodych dorosłych myszy. Co więcej, zmniejszenie syntezy PSD-95 w neuronach dCA1, za pomocą shRNA wprowadzanego do komórek z użyciem wektorów lentiwirusowych kodujących krótką szpilkę specyficzną dla mRNA PSD-95 (ang. *short hairpin RNA*, shRNA), zaburzyło wybór narożnika z nagrodą, podczas gdy preferencja nagrody pozostała niezmienną. Z kolei, zwiększona ekspresja zmutowanej wersji białka PSD-95, w wariantcie w którym Seryna 73 została zamieniona na Alaninę uniemożliwiając fosforylację tej reszty aminokwasowej (PSD95_S73A) oraz dysocjację PSD-95 od receptorów NMDA, skutkowała zarówno zaburzeniami w podejmowaniu decyzji przestrzennych, jak i nasiliła nawykowe zachowania perseweracyjne oraz osłabiła patrolowanie środowiska.

Starsze myszy, natomiast, stosowały strategie behawioralne charakteryzujące się zwiększoną tendencją do wizyt perseweracyjnych i interakcji społecznych.

Ta strategia doprowadziła do wykształcenia dużej preferencji narożnika z nagrodą, a doświadczenie treningu osłabiło korelację między poziomem białka PSD-95 i wielkością kolców dendrytycznych. Co więcej, obniżenie poziomu białka PSD-95 w dCA1 nie zaburzyło skuteczności wyboru przestrzennego ani preferencji nagrody przez stare myszy.

Przedstawione dane wskazują zatem, iż młode myszy, aby dokonywać właściwych wyborów przestrzennych, wymagają plastyczności synaptycznej w dCA1 zależnej od PSD-95, podczas gdy stare zwierzęta kierują się strategią niezależną od poziomu białka PSD-95 w regionie dCA1, polegającą na obserwacji swoich współlokatorów z klatki i trzymaniu się preferowanego narożnika w poszukiwaniu nagrody. Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują, że starsze myszy łączą alternatywne strategie behawioralne i neuronalne w celu zdobycia nagrody w złożonym środowisku.

Abstract

Cognitive processes that require spatial information rely on synaptic plasticity in the dorsal CA1 area of the hippocampus (dCA1). Since the function of the hippocampus is impaired in aged individuals, it remains unknown how aged animals make spatial choices – choices that require spatial information to distinguish between identical objects with different locations. Here, we used IntelliCage to study behavioural processes that support spatial choices of aged female mice living in a group. As a proxy of training-induced synaptic plasticity, we analysed the morphology of dendritic spines and expression of one of the most abundant synaptic scaffold proteins, PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*).

We observed that spatial choice training in young adult mice induced correlated shrinkage of dendritic spines and downregulation of PSD-95 in dCA1. Moreover, long-term depletion of PSD-95 by shRNA (*short hairpin RNA*, shPSD95) in dCA1 limited correct choices to a reward corner, while reward preference was intact. Moreover, overexpression of the mutant form of PSD-95, with Serine 73 substituted by Alanine (PSD95_S73A) preventing phosphorylation that is required for PSD-95 dissociation from NMDAR, impaired mice behaviour during spatial training and increased frequency of perseverative behaviors and patrolling.

In contrast, old mice used behavioural strategies characterised by an increased tendency for perseverative visits and social interactions. This strategy resulted in a robust preference for the reward corner during the spatial choice task. Moreover, training decreased the correlation between PSD-95 expression and the size of dendritic spines. Furthermore, PSD-95 depletion by dCA1-targeted shPSD95 did not impair place choice or reward preference in old mice. Thus, my data indicate that while young mice require PSD-95-dependent synaptic plasticity in dCA1 to make correct spatial choices, old animals observe cage-mates and stick to a preferred corner to seek the reward. This strategy is resistant to the depletion of PSD-95 in the CA1 area. Overall, my study demonstrates that aged mice combine alternative behavioural and molecular strategies to approach and consume rewards in a complex environment.

Wykaz stosowanych skrótów

- AAMI – (ang. *age-associated memory impairment*) zaburzenia pamięci związane z wiekiem
- AAV – (ang. *adeno-associated virus*) wirusy związane z adenowirusami
- AMPA – (ang. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
- AMPA – (ang. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*) receptor AMPA (aktywowany przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy)
- AP – (ang. *anterioposterior*) przednio-tylny
- CaMKII – (ang. *calcium/calmodulin-dependent kinase II*) kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny typu II
- DAPI – (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) barwnik fluorescencyjny wiążący się do DNA
- dCA1 – (ang. *dorsal CA1*) pole CA1 w grzbietowej części hipokampa
- DG – (ang. *dentate gyrus*) zakręt zębaty hipokampa
- DV – (ang. *dorsoventral*) grzbietowo-brzuszny
- EC – (ang. *entorhinal cortex*) kora śródwęchowa/entorynalna
- EDTA – (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) kwas wersenowy
- EPSP – (ang. *excitatory postsynaptic potential*) pobudzający potencjał postsynaptyczny
- GFP – (ang. *green fluorescent protein*) białko zielonej fluorescencji
- IQR – (ang. *interquartile range*) zakres międzykwartyłowy
- LTD – (ang. *long-term depression*) długotrwałe osłabienie synaptyczne
- LTP – (ang. *long-term potentiation*) długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
- LV – (ang. *lentivirus*) lentiwirus
- MAGUK – (ang. *membrane-associated guanylate kinase*) kinaza guanylanowa związana z błoną
- MGV – (ang. *mean grey value*) średnia wartość w skali szarości

MIS – (ang. *multi-innervated spines*) kolce dendrytyczne o złożonym unerwieniu

ML – (ang. *medial-lateral*) przyśrodkowo-boczny

NAc – (ang. *nucleus accumbens*) jądro półleżące

NaN₃ – (ang. *sodium azide*) azyd sodu

NDS – (ang. *normal donkey serum*) roztwór surowicy oślej

NeuN – (ang. *neuronal nuclei antigen*) białko jądrowe specyficzne dla dojrzałych neuronów; marker neuronalny

NMDA – (ang. *N-methyl-D-aspartic acid*) kwas N-metylo-D-asparaginowy

NMDAR – (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) receptor NMDA (aktywowany przez kwas N-metylo-D-asparaginowy)

PBS – (ang. *phosphate-buffered saline*) buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PFA – (ang. *paraformaldehyde*) paraformaldehyd

PCR – (ang. *polymerase chain reaction*) reakcja łańcuchowa polimerazy

PSD – (ang. *postsynaptic density*) zagęszczenie postsynaptyczne

PSD-95 – (ang. *postsynaptic density protein 95*) białko zagęszczenia postsynaptycznego 95

SEM – (ang. *standard error of measurements*) błąd standardowy średniej

shRNA – (ang. *short-hairpin RNA*) krótka sekwencja RNA o strukturze szpilki do włosów

StLM – (łac. *stratum lacunosum-moleculare*) warstwa jamisto-drobinowa

StOri – (łac. *stratum oriens*) warstwa początkowa

StPyr – (łac. *stratum pyramidale*) warstwa piramidowa

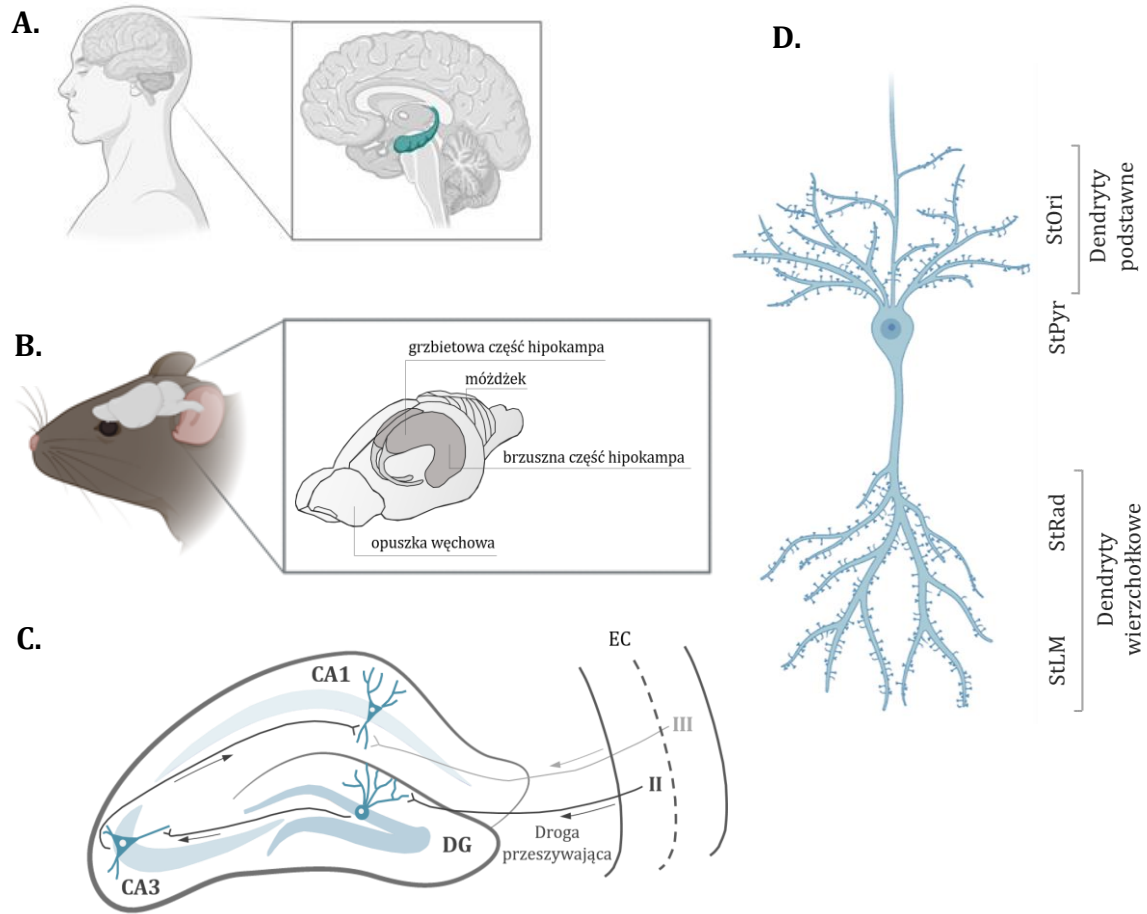
StRad – (łac. *stratum radiatum*) warstwa promienista

1. Wstęp

1.1. Hipokamp

Formacja hipokampa jest częścią przyśrodkowych płatów skroniowych i elementem układu limbicznego (**Rycina 1**) (Squire, 1992). Bierze ona udział w uczeniu się i zapamiętywaniu, a także w przetwarzaniu bodźców emocjonalnych i regulacji reakcji na stres. Pomimo występowania podobnych typów komórek w grzbietowych i brzusznych regionach hipokampa (**Rycina 1B**), różnią się one projekcjami wstępującymi i wychodzącymi, a także pełnią odmienne funkcje (Fanselow i Dong, 2010). Hipokamp grzbietowy, odpowiadający hipokampowi tylnemu u naczelnych, jest ściśle powiązany z funkcjami poznawczymi i ich zaburzeniami związanymi z wiekiem. Hipokamp brzuszny (przedni obszar u naczelnych) jest natomiast zaangażowany w regulację stanów emocjonalnych (np. stresu, lęku, gniewu) i podatności na zaburzenia afektywne (Fanselow i Dong, 2010).

Formacja hipokampa składa się z hipokampa właściwego w ramach którego wyróżnia się pola CA1, CA2 i CA3 (w niniejszej rozprawie określane jako „hipokamp”), zakrętu zębatego i podkładki (Iersen i in., 2007). W polu CA1 hipokampa dominującym typem morfologicznym neuronów są neurony piramidowe (**Rycina 1D**), które są jednymi z najlepiej opisanych komórek układu nerwowego. Ich charakterystyczne ciała o kształcie trójkąta położone są obok siebie tworząc warstwę piramidową (łac. *stratum pyramidale*). Jedna część dendrytów, zwanych podstawnymi, odchodzi w kierunku podstawnym tworząc warstwę początkową (łac. *stratum oriens*). Pozostałe dendryty, zwane wierzchołkowymi, odchodzą w kierunku szczytowym tworząc warstwę promienistą (łac. *stratum radiatum*) i kończą się w warstwie jamisto-drobinowej (łac. *stratum lacunosum-moleculare*). Aksony komórek zakrętu zębatego zwane włóknami kiciastymi (ang. *mossy fibers*) wysyłają sygnał do obszaru CA3, z którego komórki piramidalne projektują do pola CA1, głównie warstwy promienistej, poprzez aksony zwane kolateralami Schaffera (ang. *Schaffer collaterals*). Kolejna ścieżka, zwana drogą przeszywającą, wysyła projekcje bezpośrednio z neuronów z warstwy II kory śródwęczowej/entorynalnej (EC) do komórek ziarnistych zakrętu zębatego (DG) i pola CA3 hipokampa, a do pola CA1 z warstwy III EC (**Rycina 1C**).



Rycina 1. Położenie i budowa hipokampa. **A.** Położenie hipokampa w mózgu człowieka. **B.** Lokalizacja hipokampa w mózgu myszy z wyróżnioną częścią brzuszną i grzbietową (zmodyfikowane za: <https://sylvainwilliams.ca/research/>). **C.** Obwody w formacji hipokampa. **D.** Drzewo dendrytyczne neuronu piramidalnego CA1. Dendryty podstawne występują w warstwie początkowej (*stratum oriens*, StOri), natomiast dendryty wierzchołkowe tworzą warstwę promienistą (*stratum radiatum*, StRad) oraz warstwę jamisto-drobinową (*stratum lacunosum-moleculare*, StLM). Warstwa ciał komórek tworzy warstwę piramidową (*stratum pyramidale*, StPyr).

Związek między przyśrodkowymi płacami skroniowymi a pamięcią, został po raz pierwszy wskazany przez Scoville i Milnera w 1957 roku w wyniku ich oceny pacjenta H.M., Henriego Molaison'a. W celu złagodzenia nieuleczalnej epilepsji, pacjent H.M. w wieku 27 lat przeszedł rozległą, obustronną lobektomię przyśrodkowo-skroniową w ramach której usunięto większą część jego hipokampa. Zabieg chirurgiczny zmniejszył liczbę napadów, jednak H.M. utracił zdolność do tworzenia nowych wspomnień epizodycznych i obserwowano u niego trudności z orientacją przestrzenną (Scoville i Milner, 1957). W czasie gdy hipokamp zaczynał być uznawany za ośrodek formowania pamięci u naczelnych, przełomowa seria badań na gryzoniach wykazała, że aktywność neuronów hipokampa zależy od

lokalizacji zwierzęcia w przestrzeni. Pierwszy dowód potwierdzający funkcję hipokampa w tworzeniu reprezentacji przestrzeni pojawił się w 1971 r., kiedy O'Keefe i Dostrovsky poinformowali, że pewien podzbiór neuronów hipokampa jest aktywowany, gdy szczury zajmowały określone miejsce w środowisku (O'Keefe i Dostrovsky, 1971). Neurony te nazwano komórkami miejsca i okazały się występować w całym hipokampie (Jung i McNaughton, 1993; Muller i in., 1987; O'Keefe, 1976; Wood i in., 1999). Co więcej, badania następstw lezji hipokampa szczura ujawniły specyficzny deficyt w zadaniach pamięciowych opartych na nawigacji, dodatkowo potwierdzając rolę hipokampa w przetwarzaniu informacji przestrzennych (Mishkin, 1978; Morris i in., 1982; Olton i Paras, 1979). Opierając się na tych odkryciach, O'Keefe i Nadel zaproponowali, że hipokamp tworzy mapę przestrzeni, w której komórki miejsca kodują informację pozwalając zwierzęciu na lokalizację swojego ciała w środowisku (O'Keefe i Nadel, 1978).

Od tego czasu wiele badań wykazało, że aktywność neuronów w hipokampie może reprezentować znacznie więcej niż tylko położenie przestrzenne, w tym aspekty informacji kontekstowej, rozpoznawania obiektów i czasu (Eichenbaum i in., 1987; Hok i in., 2007; Manns i Eichenbaum, 2009; Moita i in., 2003; Pastalkova i in., 2008; Young i in., 1994). Badania na gryzoniach wykazały, że hipokamp bierze udział w zapamiętywaniu informacji „co” i „kiedy” podczas zapamiętywania sekwencji zapachów (Fortin i in., 2002; Kesner i in., 2002), informacji „gdzie” i „kiedy” w zapamiętywaniu sekwencji nagradzanych miejsc (Chiba i in., 1994; Kesner i Novak, 1982) oraz informacje „co” i „gdzie” w zapamiętywaniu smaku znalezionej w określonym miejscu (Day i in., 2003). Przykładowo, poza rozpoznawaniem miejsc służącym do tworzenia trajektorii przestrzennych, hipokamp może wiązać wiele różnych znaczeń obiektów z konkretnym kontekstem (Komorowski i in., 2009), a następnie łączyć serię zdarzeń w określonej kolejności w czasie do reprezentacji złożonego doświadczenia (Allen i in., 2016). Obserwacje te doprowadziły do rozszerzenia oryginalnej teorii przestrzennej mapy poznawczej, opisującej sieci hipokampa jako bardziej ogólny system przetwarzania relacji, który umożliwia szybkie skojarzenie przestrzennych, czasowych i konceptualnych aspektów doświadczenia (gdzie, kiedy, co) (Eichenbaum i in., 2012; Eichenbaum i Cohen, 2001). Ta perspektywa służy ujednoliceniu ogólnej roli hipokampa w tworzeniu pamięci

z badań na ludziach i naczelnych z obszernymi badaniami funkcji przetwarzania przestrzennego w doświadczeniach na gryzoniach.

Zdolność uczenia się i zapamiętywania lokalizacji obiektów oraz kojarzenia ich z innymi bodźcami jest zachowaniem adaptacyjnym niezbędnym dla przetrwania. Dotychczasowe badania dowodzą, że hipokamp jest istotny nie tylko do kodowania pamięci długotrwałej, ale odgrywa również ważną rolę w tworzeniu krótkotrwałej pamięci operacyjnej (roboczej). Pamięć operacyjna stanowi istotny proces poznawczy, będący czasowym łącznikiem pomiędzy momentem percepcji zmysłowej a wykorzystaniem zdobytej informacji do kolejnych działań. W oryginalnym modelu Baddeley i Hitch scharakteryzowali pamięć operacyjną jako wieloelementowy model pamięci złożony z centralnego systemu wykonawczego odpowiedzialnego za obsługę i przetwarzanie informacji oraz z systemów podrzędnych: pętli fonologicznej (odpowiedzialnej za przechowywanie i przetwarzanie w pamięci informacji werbalnych), szkicownika wzrokowo-przestrzennego (odpowiedzialnego za przechowywanie i zarządzanie dostępnymi informacjami wizualnymi) oraz buforu epizodycznego (integrującego informacje z pętli fonologicznej, szkicownika wzrokowo-przestrzennego, pamięci długotrwałej i percepcyjnego wejścia do spójnej sekwencji) (Baddeley, 1992, 1998, 2000, 2012; Baddeley i Hitch, 1974). Ten rodzaj pamięci charakteryzuje się ograniczoną pojemnością, krótkim okresem przechowywania informacji, a jej zawartość jest stale aktualizowana. Przestrzenna pamięć operacyjna dotyczy przechowywania i manipulowania informacjami wizualno-przestrzennymi, przywołującymi kształty i faktury oraz położenie i sekwencje przestrzenne (Logie i Pearson, 1997). Stanowi to podstawę zachowań związanych z żerowaniem, np. zapamiętywanie gdzie właśnie byłeś, abyś mógł przyjąć właściwą strategię poszukiwania. Podstawowym testem do badania przestrzennej pamięci operacyjnej u gryzoni jest labirynt w kształcie litery T lub 8-ramienny labirynt promienisty z naprzemiennym położeniem nagrody (Deacon i Rawlins, 2006; Olton i Paras, 1979). Hipokamp zaangażowany jest także w dokonywanie **wyboru przestrzennego** – wyboru wykorzystującego informacje przestrzenne do podejmowania właściwych zachowań, w szczególności gdy informacja przestrzenna potrzebna jest do odróżnienia pomiędzy identycznymi lub łudząco podobnymi obiektami o różnym znaczeniu emocjonalnym (wybór pomiędzy dwoma identycznymi ramionami labiryntu T gdy nagroda jest tylko w jednym z nich)

(Bannerman i in., 2012, 2014). Naturalnym odruchem jest wybór bliższego ramienia labiryntu, jednak w czasie trafego wyboru przestrzennego zwierzę umie powstrzymać ten odruch jeśli nagradzane ramie jest dalej. Doświadczenia Bannermana dowodzą, że plastyczność synaptyczna zachodząca w hipokampie jest niezbędna w tym procesie.

Wraz z wiekiem obserwowane jest pogorszenie się funkcji poznawczych, a zwłaszcza procesów zależnych od hipokampa, które wymagają informacji przestrzennej (Hedden i Gabrieli, 2004; Kennard i Woodruff-Pak, 2011; Tromp i in., 2015). Jednak pomimo zauważalnego obniżenia sprawności motorycznej i funkcji poznawczych wraz z postępem starzenia, zarówno osoby starsze, jak i zwierzęta potrafią wykorzystywać i przetwarzać informacje przestrzenne do kierowania swoim zachowaniem (Aziz i in., 2019; Kiryk i in., 2011; Kwapis i in., 2019; Śliwińska i in., 2020). Osobniki w podeszłym wieku często stosują alternatywne strategie behawioralne do wykonania zadań przestrzennych (Bach i in., 1999), potrzebują więcej prób treningowych (Gallagher i in., 1993; Murphy i in., 2004), a uformowane wspomnienia trudniej są aktualizowane (Aziz i in., 2019; Jones i in., 2015). Obserwacje te sugerują obecność alternatywnych mechanizmów neuronalnych leżących u podłoża procesów poznawczych osobników w podeszłym wieku.

1.2. Plastyczność synaptyczna

Choć pierwsze wzmianki na temat plastyczności ludzkiego mózgu odnaleźć można w pracach psychologów z końca XIX w., pojęcie plastyczności neuronalnej zostało wprowadzone dopiero w 1948 r. przez polskiego naukowca Jerzego Konorskiego. W swojej książce przedstawił on teorię zakładającą, że komórki nerwowe mogą ulegać trwałym zmianom pod wpływem nowych doświadczeń. Tą właściwość komórek nazwał plastycznością neuronalną (Konorski, 1948). Stanowiła ona przełom w dziedzinie neuronauk. Zaledwie rok później kanadyjski psycholog Donald Hebb sformułował tezę, będącą podstawową zasadą zjawiska **plastyczności synaptycznej** leżącą u podłoża pamięci. Hebb postulował, że pamięć jest kodowana jako zmiana przepływu informacji pomiędzy neuronami, która wymaga równoczesnego i powtarzalnego pobudzenia tych komórek (Hebb, 1949). Zaproponował on, że kształtowanie mózgu w czasie nabywania nowych wiadomości

wiąże się ze zmianami zachodzącymi w komórkach nerwowych. Zmiany te dotyczą struktury synapsy, czyli połączeń między komórkami nerwowymi. Jeśli kilka komórek nerwowych otrzymuje bodziec w tym samym czasie, to aktywności zakończeń pre- i postsynaptycznych są skorelowane oraz wytwarzają się potencjały czynnościowe prowadzące do zwiększenia siły tych połączeń synaptycznych.

Synapsy

Synapsa jest miejscem kontaktu między dwiema komórkami nerwowymi lub między neuronem a komórką mięśniową (efektorem). Synapsy składają się z części presynaptycznej i postsynaptycznej oddzielonych szczeliną synaptyczną. Ze względu na sposób przekazywania informacji pomiędzy komórkami możemy wyróżnić synapsy elektryczne i chemiczne. Synapsy elektryczne przekazują sygnał za pomocą nieorganicznych jonów, np. Na^+ , Ca^{2+} oraz H^+ . Istotą działania przekaźnictwa chemicznego jest uwolnienie neuroprzekaźników z pęcherzyków presynaptycznych do szczeliny synaptycznej i połączenie się neuroprzekaźnika z receptorem w błonie postsynaptycznej. Główne neuroprzekaźniki to aktywujący kwas glutaminowy oraz hamujący aktywność neuronu postsynaptycznego – kwas γ -aminomasłowy (GABA). Uruchomiona za pomocą neuroprzekaźników, molekularna kaskada reakcji aktywuje następnie ekspresję genów i syntezę białek – jest to tzw. **plastyczność funkcjonalna** obejmująca zmiany właściwości istniejących synaps i polega ona na zmianie składu i liczby receptorów oraz modyfikacji białek wpływających na ich aktywność (Fanselow i Poulos, 2005; Malinow i Malenka, 2002) oraz jednocześnie powoduje zmiany w strukturze synapsy – tzw. **plastyczność strukturalna**, która wiąże się ze zmianą wielkości synaps (Grutzendler i in., 2002; Holtmaat i Svoboda, 2009; Trachtenberg i in., 2002; Xu i in., 2009; Yang i in., 2009). Te dwa zjawiska są ściśle powiązane i w większości przypadków jedno bez drugiego nie istnieje. Głównym powodem ich rozróżnienia jest to, że stosowane metody badania struktury rzadko umożliwiają wgląd w funkcję, i odwrotnie.

1.3. Strukturalne komponenty synaps pobudzających

Większość synaps pobudzających jest zlokalizowanych na niewielkich wypustkach błony komórkowej neuronów nazywanych **kolcami dendrytycznymi**.

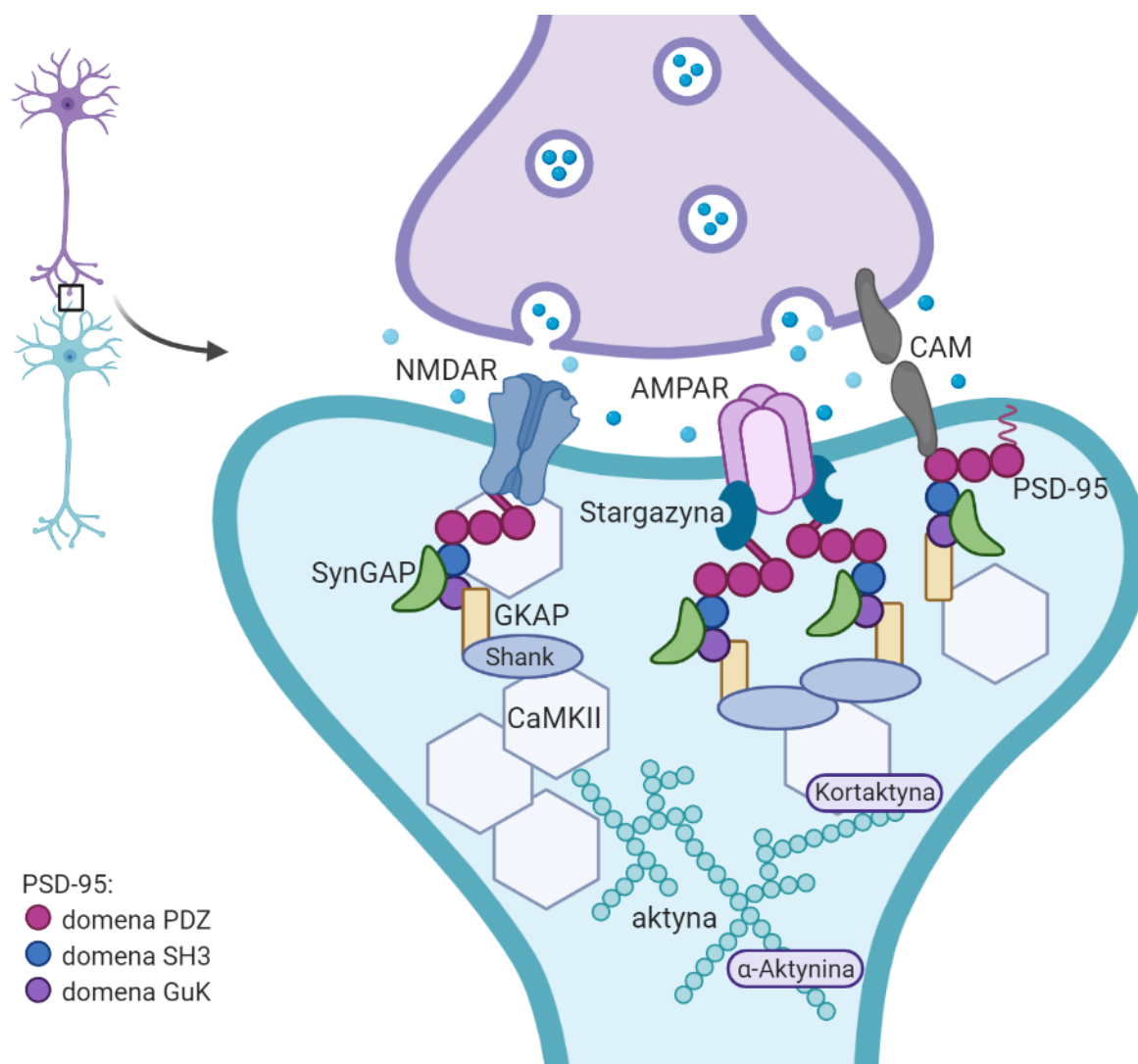
Kolce dendrytyczne zostały odkryte przez Santiago Ramona y Cajala, który sugerował, iż są one podstawowym elementem komórkowym zaangażowanym w procesy uczenia się i pamięci (Ramón y Cajal, 1896). Kolce dendrytyczne składają się typowo z bulwiastej głowy i szyi. Choć tradycyjnie podzielone są na kategorie kształtów, dziś wiemy, że są to etapy pośrednie w procesie dojrzewania. Nowo powstałe kolce, często pozbawione są zagęszczeń synaptycznych (PSD) i charakteryzują się wydłużonym kształtem. Jeśli kolec podłużny jest stymulowany, może przyjąć kształt grzyba wynikający ze wzrostu synapsy. Kolce grzybkowate są najbardziej stabilne (Berry i Nedivi, 2017; Bourne i Harris, 2007; Chen i Sabatini, 2012). W dojrzałym mózgu około 25% kolców dendrytycznych ma morfologię grzyba, a 10% kolców dendrytycznych stanowią formy o kształtach niedojrzałych – filopodialnych. Pozostała większość zalicza się do kategorii form pośrednich (Bourne i Harris, 2007).

Kolce dendrytyczne są bardzo dynamiczne – mogą pojawiać się i zanikać oraz zmieniać swój kształt i rozmiar (Attardo i in., 2015). Co ciekawe, w obrębie neuronu piramidального pola CA1, gęstość i kształt kolców dendrytycznych różni w zależności od miejsca na dendrycie – gęstsze i mniejsze kolce są w odcinkach proksymalnych, a rzadsze i większe w częściach dystalnych dendrytu. Odpowiednia dystrybucja gęstości i rozmiaru kolców na drzewie dendrytycznym wydaje się kluczowa dla sprawnego przekazywania informacji z dendrytów do ciała komórki (Katz i in., 2009; Nicholson i in., 2006). Nieprawidłowości w morfologii i gęstości kolców dendrytycznych są często związane z patologiami neurologicznymi i neurodegeneracyjnymi. Przykładem jest zwiększona gęstość kolców w zaburzeniach ze spektrum autyzmu, czy przeciwnie, ich zmniejszona ilość w schizofrenii oraz chorobie Alzheimera (Penzes i in., 2011).

Struktura kolca dendrytycznego utrzymywana jest przez cytoszkielet aktynowy i związane z nim białka, które połączone są z tzw. **zagęszczeniem postsynaptycznym (PSD)** (Korobova i Svitkina, 2010). Po raz pierwszy zobrazowano ją w synapsie pobudzającej za pomocą mikroskopii elektronowej (Gray, 1959). W obrazie tym, postsynaptyczna część synapsy pobudzającej przedstawia się jako zgrubienie błony komórkowej i region o dużej gęstości elektronowej skąd pochodzi nazwa PSD. Gęstość postsynaptyczną stanowią kanały jonowe, m.in. jonotropowe receptory glutaminianu, białka, które kotwiczą w błonie

komórkowej receptory neuroprzekaźników, a także białka strukturalne (m.in. PSD-95 i inne z rodziny MAGUK (kinazy guanylanowe związane z błoną)), białka adhezyjne łączące pre- i postsynaptyczną stronę synapsy, kinazy i fosfatazy oraz elementy cytoszkieletu komórkowego (Okabe, 2007; Sheng i Hoogenraad, 2007). Szacuje się, że w PSD może być obecnych od kilkuset (~100-400) do nawet 1000 różnych białek, które występują w wielu kopiach (Chen i in., 2005; Sheng i Hoogenraad, 2007). Najliczniej występującymi są: PSD-95 (białko zagęszczenia postsynaptycznego 95 kDa), CaMKII (kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny typu II), SynGap (białko aktywujące GTPazę Ras) i aktyna (Cho i in., 1992; Walikonis i in., 2000; Walsh i Kuruc, 1992). Oszacowano, że w średniej wielkości PSD najliczniej występującym białkiem jest CaMKII, którą szacuje się na około 5600 kopii, ponadto występuje tam około 300 kopii białka PSD-95 (Chen i in., 2005), 360 kopii SynGAP, 20 kopii receptorów NMDA, czy 15 kopii receptorów AMPA (Chen i in., 2005; Cheng i in., 2006; Nimchinsky i in., 2004; Pologruto i in., 2004; Sheng i Hoogenraad, 2007).

PSD można podzielić na rdzeń (ang. *core*) i bardziej zmienną, jeśli chodzi o skład białek, warstwę płaszczu (ang. *pallium*) (**Rycina 2**) (Dosemeci i in., 2016). W błonie postsynaptycznej zakotwiczone są m.in. receptory, kanały jonowe i cząsteczki adhezyjne. Tuż pod błoną postsynaptyczną wyróżnia się warstwę rdzenia w której obecne są białka pomocnicze, jak np. stargazyna, połączone w kompleksy z receptorami AMPA i białkami z rodziny MAGUK, jak np. PSD-95 lub SAP-97. Przedłużenie rdzenia PSD stanowi płaszcz w którym zlokalizowane są enzymy, np. CaMKII oraz białka rusztowania kolca dendrytycznego, takie jak Shank i Homer, a w dalszej części cytoszkielet aktynowy i związane z nim białka (Dosemeci i in., 2016; Sheng i Hoogenraad, 2007).



Rycina 2. Schemat organizacji białek PSD i interakcji białko-białko. Kontakty między białkami wskazują na ustaloną interakcję między nimi (zmodyfikowane za: Sheng i Hoogenraad, 2007).

Kolce dendrytyczne różnią się pod względem wielkości i kształtu zagęszczenia postsynaptycznego. PSD proste (ang. *macular*) o jednolitej, zwartej budowie, występują zazwyczaj na mniejszych i cieńszych kolcach dendrytycznych, a perforowane/złożone (ang. *perforated/complex*) PSD o nieciągłej morfologii, obecne są na większych i bardziej dojrzałych kolcach (Ganeshina i in., 2004; Nicholson i in., 2006). W literaturze udokumentowano również występowanie PSD całkowicie podzielonego, które nazywa się PSD segmentowanym, a kolce w których występuje więcej niż jedno PSD (i każde z nich jest unerwione przez inny akson) określa się mianem kolców o złożonym unerwieniu (ang. *multi-innervated spines*, MIS). Wydaje się, że występowanie kolców MIS jest oznaką trwającej przebudowy synaps,

ponieważ ich częstotliwość wzrasta po indukcji plastyczności synaptycznej (Stewart i in., 2005) oraz występują w przypadku upośledzenia prawidłowej przebudowy synaps i nadekspresji białek tworzących rusztowanie PSD (Nikonenko i in., 2008; Pogliani i in., 2011; Radwanska i in., 2011). MIS mogą odgrywać rolę w tworzeniu pamięci, gdy podstawowe szlaki są нефunkcjonalne i mogą uczynić pamięć bardziej odporną na przebudowę (Giese i in., 2015). Wielkość obszaru PSD koreluje z wielkością głowy kolca i liczbą receptorów AMPA: im większy kolec, tym większa i silniejsza synapsa (Arellano, 2007; Harris i in., 1992; Harris i Stevens, 1989), co pozwala na traktowanie rozmiaru kolca jako przybliżonego wskaźnika siły synaps (Kopec, 2006; Matsuzaki i in., 2004).

1.4. Plastyczność funkcjonalna

Dwoma najlepiej zbadanymi formami plastyczności synaps są **długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP)** oraz **długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD)**, które zależą od podtypu receptorów glutaminianu – receptorów NMDA (Bliss i Lømo, 1973; Lüscher i Malenka, 2012).

Zjawisko LTP zostało odkryte w hipokampie, czyli części mózgu odpowiedzialnej za pamięć długotrwałą i polega na zwiększeniu intensywności przekazywania sygnału pomiędzy dwoma aktywnymi neuronami. Pobudzenie neuronów poprzez silną stymulację prowadzi do intensywnego uwalniania neuroprzekaźnika – glutaminianu przez synapsę neuronu presynaptycznego do przestrzeni międzykomórkowej. Oddziałuje on na receptory glutaminianu, które znajdują się na synapsach neuronów w polu CA1. Silna aktywacja neuronu presynaptycznego powoduje uwolnienie znacznych ilości glutaminianu, czemu towarzyszy przedłużone otwarcie receptorów AMPA i zwiększony przepływ jonów sodu (Na^+) do komórki postsynaptycznej. W efekcie, błona komórkowa ulega mocniejszej depolaryzacji oraz dochodzi do dysocjacji jonu magnezu z miejsca wiążącego w kanale receptora NMDA, dzięki czemu następuje jego otwarcie i wniknięcie do wnętrza komórki postsynaptycznej jonów wapnia (Ca^{2+}) i sodu. Zwiększenie stężenia jonów Ca^{2+} aktywuje z kolei liczne procesy biochemiczne, prowadząc do indukcji LTP i wzmocnienia synapsy: wprowadzenia dodatkowych receptorów AMPA do synapsy, zwiększenia liczby i stabilności kolców

dendrytycznych, a także powiększenia PSD i polimeryzacji filamentów aktynowych (Bosch i Hayashi, 2012; Fukazawa i in., 2003; Lüscher i Malenka, 2012). Zjawisko LTD zależne od NMDAR związane jest z osłabieniem funkcji synaps, kurczeniem się kolców dendrytycznych i zmniejszeniem ich liczby, depolimeryzacją aktyny oraz redukcją liczby receptorów glutaminianu na powierzchni błony synaptycznej (Bosch i Hayashi, 2012; Citri i Malenka, 2008; Lüscher i Malenka, 2012; Malenka, 1994).

Warto zwrócić uwagę na fakt, że w obszarze CA1 hipokampa zarówno Hebbowska plastyczność synaptyczna, jak i uczenie, zależą od receptorów NMDA (Shimizu i in., 2000). Uważa się, że formy plastyczności synaptycznej oparte na regułach Hebba i zależne od receptorów NMDA (NMDAR) są podstawowymi mechanizmami leżącymi u podstaw procesów poznawczych zależnych od hipokampa (Kessels i Malinow, 2009; Malinow i Malenka, 2002).

Większość dotychczasowych badań łączyła funkcje poznawcze z LTP (Bliss i Collingridge, 1993; Gruart i in., 2006; Morris i in., 2003; Whitlock i in., 2006), jednak coraz więcej danych wskazuje, że niektóre procesy poznawcze mogą również prowadzić do indukcji długotrwałej depresji transmisji synaptycznej (Citri i Malenka, 2008; Connor i Wang, 2016; Kemp i Manahan-Vaughan, 2007). Zgodnie z tym, istnieją doniesienia, w których wiąże się upośledzenie LTP i LTD ze zmniejszoną zdolnością do tworzenia wspomnień zależnych od hipokampa u starzejących się zwierząt (Bach i in., 1999; Luo i in., 2015; Temido-Ferreira i in., 2020). Udokumentowane zostały alternatywne formy plastyczności synaptycznej biorące udział w formowaniu się pamięci starszych zwierząt, takie jak tworzenie się kolców dendrytycznych o złożonym unerwieniu (z ang. *multi-innervated spines*, MIS) (Aziz i in., 2019), czy LTD niezależne od receptorów NMDA (Lee i in., 2005). Wciąż jednak, słabo poznany zostaje wpływ starzenia się na procesy behawioralne i molekularne wspierające funkcje poznawcze. Zrozumienie tych procesów jest niezbędne do opracowania nowych strategii terapeutycznych wspierających zdrowy proces starzenia.

1.5. Molekularne podłoże plastyczności synaptycznej w synapsach glutaminianergicznych

W zagęszczeniu postsynaptycznym zlokalizowane jest wiele białek zmieniających aktywność synapsy w czasie stymulacji synaptycznej (Bosch i in.,

2014; Sheng i Hoogenraad, 2007). Choć niewątpliwie wiele z nich jest istotnych dla procesów plastyczności synaptycznej prowadzącej do powstania i przebudowy pamięci, to w rozprawie tej chciałabym się skupić i opisać przede wszystkim te najistotniejsze dla zrozumienia prowadzonych przeze mnie badań, czyli jonotropowe receptory glutaminianu oraz białka rusztowania synaptycznego.

1.5.1. Receptory jonotropowe glutaminianu: AMPAR i NMDAR

Ze względu na fakt, iż glutaminianergiczna transmisja synaptyczna, a w szczególności plastyczność synaps odgrywają kluczową rolę w uczeniu się i pamięci zależnej od hipokampa, to aktywacja jonotropowych receptorów glutaminianu leży u podłoża większości opisanych form tej plastyczności. Nazwa **receptora AMPA (AMPAR)** pochodzi od specyficznego agonisty kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA). AMPAR jest jednym z najpowszechniej występujących receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym i bierze udział w tzw. szybkim przekąźnictwie synaptycznym. Receptory AMPA są heterotetramerami zbudowanymi z podjednostek GluA1-4, które są przepuszczalne dla jonów Na^+ i K^+ , a niektóre również dla Ca^{2+} . Podjednostka GluA2 odgrywa kluczową rolę w określaniu właściwości kanałów jonowych ze względu na fakt, że jest nieprzepuszczalna dla jonów Ca^{2+} (Lu i in., 2009; Wisden i Seeburg, 1993). Występowanie podjednostek receptora AMPA różni się istotnie w różnych typach komórek hipokampa, co skutkuje różnymi właściwościami receptorów między np. neuronami pobudzającymi i hamującymi. W komórkach hipokampa dominują receptory AMPA składające się z podjednostek GluA1 i GluA2, podczas gdy GluA3 jest obecny w mniejszej liczbie, a GluA4 tylko w komórkach embrionalnych i wczesnych komórkach postnatalnych (Henley i Wilkinson, 2016; Petralia i Wenthold, 1992).

Receptory NMDA (NMDAR) różnią się od receptorów AMPA kilkoma ważnymi właściwościami, w tym wysoką przepuszczalnością jonów Ca^{2+} , blokadą kanału jonowego przez jon Mg^{2+} (jego zwolnienie następuje podczas depolaryzacji błony postsynaptycznej, np. w wyniku silnej aktywacji receptorów AMPA), wolniejszą kinetyką aktywacji, dłuższym czasem otwarcia i większym powinowactwem do glutaminianu (Dingledine i in., 1999). Te właściwości receptorów NMDA leżą u podstaw plastyczności synaptycznej zależnej od NMDAR – mechanizmu

zaangażowanego w wiele typów uczenia się i tworzenia pamięci (Lüscher i Malenka, 2012; Shimizu i in., 2000; Tsien i in., 1996). Agonistą NMDAR jest kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA). Receptory NMDA są tetramerami, które różnią się składem podjednostkowym nadającym receptorom specyficzne właściwości biofizyczne. Składają się z dwóch stałych podjednostek GluN1 oraz podjednostek GluN2 lub GluN3, wśród których wyróżnia się jeszcze odpowiednie podtypy: cztery dla GluN2 (GluN2A – GluN2D) i dwa podtypy GluN3 (GluN3A i GluN3B) (Paoletti i in., 2013). Wciąż pozostaje przedmiotem badań, czy określone podtypy receptorów wykonują określone zadania w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), natomiast dowody wskazują, że szczególnie receptory GluN1 (wiążące glicynę) oraz GluN2A i GluN2B (wiążące glutaminian) odgrywają kluczową rolę w synapsach pobudzających (Al-Hallaq i in., 2007; Köhr, 2006).

1.5.2. Białka rusztowania synaptycznego: MAGUK

W zagęszczeniu postsynaptycznym, oprócz receptorów i cząsteczek adhezyjnych, gromadzą się również białka rusztowania, które wspólnie z pozostałymi elementami umożliwiają wydajną odpowiedź synaptyczną. Funkcją białek rusztowania jest stabilne połączenie dwóch lub więcej białek określonej ścieżki sygnałowej w komórce. Związanie białek w kompleks umożliwia ich ścisłe oddziaływanie ze sobą i przekazanie sygnału (np. fosforylacji). Ponadto, białko rusztowania poprzez wiązanie składników ścieżki sygnałowej chroni je również przed inaktywacją lub degradacją. W zagęszczeniu postsynaptycznym wyróżnia się trzy główne grupy białek rusztowania: MAGUK, Shank i Homer. Najlepiej zbadaną rodziną białek rusztowania jest grupa kinaz guanylowych związanych z błoną komórkową (MAGUK, ang. *Membrane Associated Guanylate Kinase*) odgrywających rolę w regulacji transportu receptorów synaptycznych do błony komórkowej, plastyczności synaptycznej, jak i w utrzymaniu stabilnego rusztowania molekularnego samego PSD. Do tej grupy białek zalicza się: PSD-95, PSD-93, SAP-102 oraz SAP-97. Strukturalnie wszystkie te białka zawierają trzy N-końcowe domeny PDZ, domenę SH3 homologiczną do fragmentu białek Src (ang. *Src homology 3 domain*) oraz C-końcową katalitycznie nieaktywną domenę kinazy guanylowej GK (ang. *Guanylate Kinase*) (**Rycina 3**) (Won i in., 2017). Nazwa domeny PDZ pochodzi

od pierwszych liter trzech białek u których po raz pierwszy odkryto te domeny: białko PSD-95, białko Dlg (ang. *Disc large*; białko, którego mutacje prowadzą do nowotworowego przerostu dysku imaginalnego u *Drosophila melanogaster*) oraz białko ZO-1 (ang. *Zonula Occludens-1*, białko obwódki zamykającej w komórkach nabłonkowych). Choć domeny PDZ, SH3 i GK są wysoce konserwatywne wśród różnych białek MAGUK, istnieją również regiony rozbieżne, szczególnie w obrębie N-końca. Wymienione powyżej białka MAGUK, z wyjątkiem SAP-97 od strony N-końca posiadają miejsce palmitoilacji (El-Husseini i in., 2002).

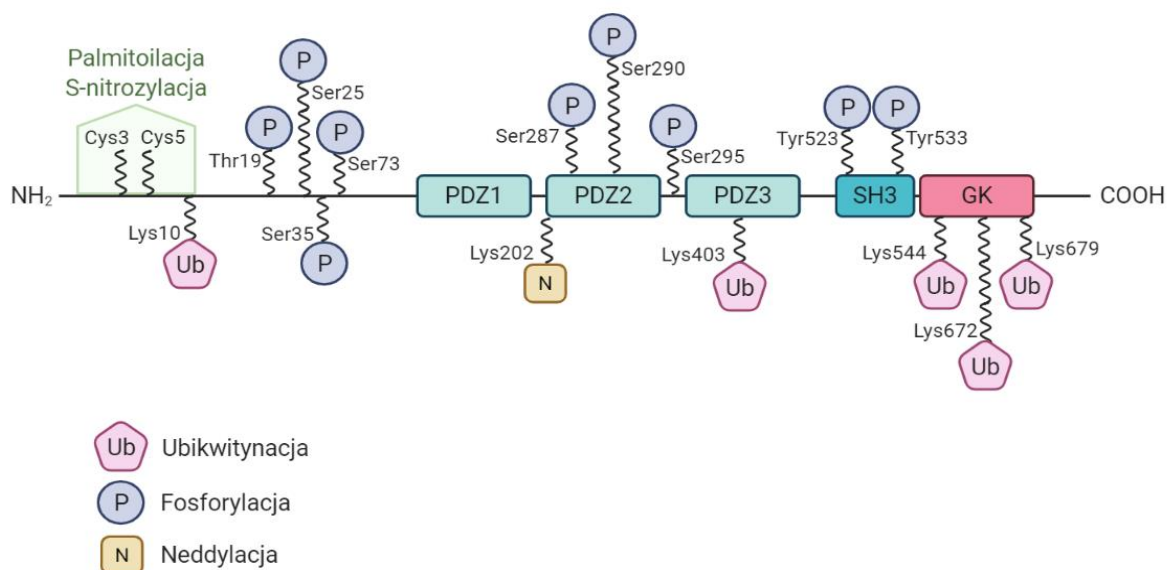
Najliczniej występującym białkiem MAGUK jest **PSD-95** kodowane przez gen *Dlg4* (około 300 cząsteczek na PSD) (Chen i in., 2005; Cho i in., 1992). Opierając się na danych z ilościowej spektrometrii mas z przodomózgowie dorosłego szczura, PSD-95 występuje w ~6-krotnie większej ilości niż PSD-93, ~8-krotnie większej w porównaniu z SAP-102 i ~40-krotnie większej w porównaniu z SAP-97 (Cheng i in., 2006). Wykazano, że oba końce PSD-95 są ważne dla jego lokalizacji i funkcji, ale to pierwsze dwie domeny PDZ (PDZ1/2) PSD-95 promują lokalizację PSD-95 w zagęszczeniu postsynaptycznym, wiążą się z C-końcem drugiej podjednostki receptora NMDA (GluN2), są kluczowe dla indukcji LTD oraz transportu i lokalizacji AMPAR w synapsie (Nagura i in., 2012; Xu i in., 2008). Z kolei sekwencja N-końcowa bierze udział w regulacji funkcji AMPAR, lecz nie ma wpływu na LTD (Xu i in., 2008).

1.5.2.1. Modyfikacje potranslacyjne PSD-95

Liczne modyfikacje potranslacyjne PSD-95 pozwalają modulować jego lokalizację w obrębie kolca dendrytycznego, wpływając w ten sposób na regulację transmisji synaptycznej. Znane modyfikacje potranslacyjne PSD-95 można podzielić na dwie grupy: modyfikacje promujące lokalizację synaptyczną tego białka i takie, które promują eliminację PSD-95 z synapsy (Vallejo i in., 2017). Po translacji PSD-95 może ulegać następującym modyfikacjom (**Rycina 3**):

- palmitoilacji, prowadzącej do akumulacji PSD-95 w synapsie w postaci nanodomen oraz regulującej transport AMPAR do błony komórkowej i kotwiczenie NMDAR w PSD (El-Husseini i in., 2002; El-Husseini i Bredt, 2002; Fukata i in., 2013; Li i in., 2003; Noritake i in., 2009; Schnell i in., 2002);

- S-nitrozytacji, konkurującej z palmitoilacją i utrzymującą PSD-95 w formie zdepalmitoilowanej, powodując dysocjację PSD-95 z miejsc synaptycznych, a tym samym rozpraszając synaptyczne skupiska tego białka i w konsekwencji powodując endocytozę AMPAR z błony komórkowej (El-Husseini i in., 2002; Fukata i Fukata, 2010; Ho i in., 2011; Nakamura i Lipton, 2016; Stamler i in., 1992);
- ubikwitynacji, powodującej usunięcie białka PSD-95 z synapsy poprzez degradację zależną od proteasomu, a w konsekwencji utratę AMPAR z błony postsynaptycznej, regulując zatem molekularną organizację synaps glutaminianergicznych i odgrywając ważną rolę w regulacji siły synapsy oraz plastyczności synaptycznej (Bianchetta i in., 2011; Colledge i in., 2003; Hershko i in., 1983; Opazo i in., 2014; Waataja i in., 2007);
- neddylacji, zapobiegającej odłączeniu PSD-95 z PSD i w konsekwencji dyfuzji poza kołec dendrytyczny co wspiera jego stabilność; wpływa również stymulująco na dojrzewanie kolców i synaps pobudzających (El-Husseini i in., 2000; Vogl i in., 2015);
- oraz fosforylacji, którą szerzej scharakteryzuję poniżej ze względu na badanie jej funkcji w niniejszej dysertacji.



Rycina 3. Schemat struktury białka PSD-95 wraz z potranslacyjnymi modyfikacjami specyficznych reszt aminokwasowych. PSD-95 złożone jest z trzech domen PDZ na końcu -N' oraz domen SH3 i GK na końcu -C' białka. Na schemacie przedstawiono procesy palmitoilacji i S-nitrozylacji (zielony), ubikwitynacji (Ub, różowy), fosforylacji (P, niebieski) oraz neddytacji (żółty) wraz z lokalizacją wiązania specyficznych reszt aminokwasowych (zmodyfikowane za: Vallejo i in., 2017).

Fosforylacja

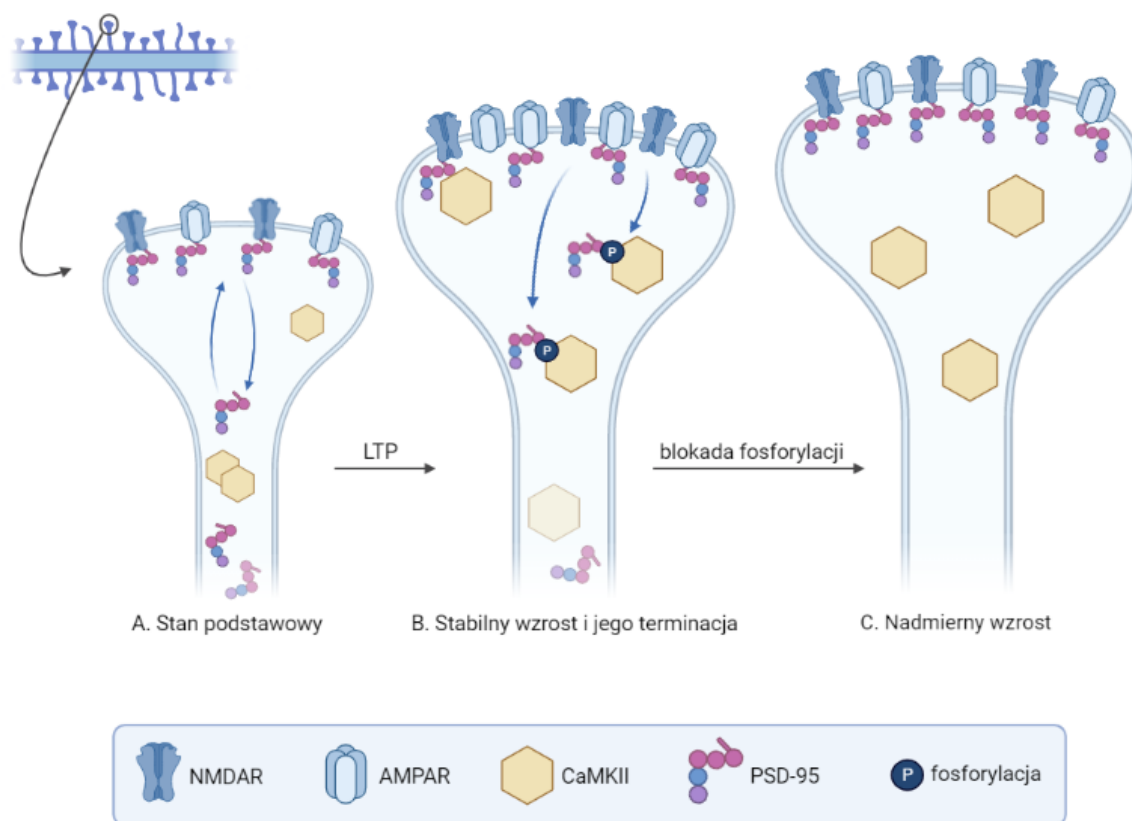
PSD-95 jest fosforylowane na wielu resztach serynowych, treoninowych i tyrozynowych (**Rycina 3**). Kinaza c-Abl fosforyluje PSD-95 na reszcie tyrozyny 533. Zahamowanie aktywności kinazy c-Abl zmniejsza fosforylację tej tyrozyny w PSD-95, prowadząc do zmniejszenia skupisk tego białka w miejscach postsynaptycznych i w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia liczby synaps (Perez de Arce i in., 2010). N-końcową domenę PSD-95 (treonina 19, seryna 25 i seryna 35) opisano jako miejsca fosforylacji przez kinazę zależną od cykliny 5 (CDK5). Aktywowana CDK5 zmniejsza zdolność PSD-95 do multimeryzacji, co prowadzi do zmniejszenia rozmiaru klastrów PSD-95 (Morabito i in., 2004).

Fosforylacja reszt serynowych lub treoninowych na PSD-95 wpływa na interakcje PSD-95/NMDAR. W odniesieniu do modyfikacji, które wpływają na NMDAR wykazano, że kinaza kazeinowa II (CK2) fosforyluje resztę seryny 1480 podjednostki PDZ GluN2B. Fosforylacja ta reguluje oddziaływanie receptorów NMDA z PSD-95 oraz moduluje funkcję i plastyczność synaps pobudzających (Chung i in., 2004). Fosforylacja seryny 295, która znajduje się pomiędzy domenami PDZ2 i PDZ3

PSD-95, również reguluje lokalizację białka (Jaffe i in., 2004). Fosforylacja seryny 295, w której pośredniczy JNK1 i która zależna jest od Rac1, sprzyja akumulacji synaptycznej PSD-95 i wpływa na wzmocnienie synaptyczne. Ponadto wiadomo, że defosforylacja seryny 295 przez fosfatazy PP1 i PP2A jest wymagana do internalizacji AMPAR i LTD (Kim i in., 2007). Dane te są zgodne z innymi doniesieniami wskazującymi, że postsynaptyczna obecność PSD-95 stanowi o sile synaptycznej poprzez kontrolę transportu AMPAR (Ehrlich i Malinow, 2004; El-Husseini i in., 2000; Schnell i in., 2002; Xu i in., 2008).

Fosforylacja PSD-95 na treoninie 19 przez kinazę syntazy glikogenu-3 β (GSK-3 β) wyzwała destabilizację PSD-95 i jest ważnym krokiem prowadzącym do mobilizacji AMPAR i LTD (Nelson i in., 2013). Wiadomo również, że fosforylacja PSD-95 przez CaMKII na serynie 73, zlokalizowanej w domenie PDZ1 jest odpowiedzialna za regulację szlaku przekazywania sygnału dla NMDAR (Gardoni i in., 2006; Tsui i Malenka, 2006). Fosforylacja ta destabilizuje PSD-95 w PSD i promuje transport PSD-95 ze stymulowanego kolca dendrytycznego. Proces ten wpływa na terminację wzrostu stymulowanego kolca i plastyczność synaptyczną (Steiner i in., 2008).

PSD-95 to mobilna cząsteczka ułożona w nanodomenach synaptycznych ulegających stałej przebudowie (Wegner i in., 2018). Po aktywacji synapsy, jedno z najliczniej występujących białek, CaMKII, fosforyluje PSD-95 na serynie 73. Ta specyficzna modyfikacja znacznie obniża powinowactwo pierwszej domeny PDZ PSD-95 do podjednostki GluN2A receptora NMDA, co umożliwia fosforylację NMDAR przez CaMKII (Gardoni i in., 2006), oraz promuje przebudowę kolca dendrytycznego i PSD (Steiner i in., 2008) (**Rycina 4B**). Rolę fosforylacji reszty serynowej 73 testowano z użyciem fosfomimetycznego wariantu PSD-95_S73D, gdzie seryna 73 została zastąpiona kwasem asparaginowym oraz wersją białka PSD-95_S73A, gdzie serynę zastąpiono alaniną która nie ulega fosforylacji. Steiner i współpracownicy (2008) dowiedli, że PSD-95_S73D destabilizuje strukturę i funkcję kolca dendrytycznego. Z kolei, punktowa substytucja seryny 73 na alaninę, blokuje eliminację PSD-95 z synapsy prawdopodobnie powodując jej nadmierną stabilność i sztywność oraz wzmożony wzrost kolca (**Rycina 4C**). Sugeruje to, iż transport PSD-95 i ilość tego białka w synapsie aktywnie reguluje jej stabilność i funkcję.



Rycina 4. Model regulacji plastyczności strukturalnej w trakcie przebudowy synapsy zależnej od fosforylacji białka PSD-95 na serynie 73 przez CaMKII (zmodyfikowane za Steiner i in., 2008). **A.** W stanie podstawowym cząsteczki PSD-95 są stabilnie włączane/usuwane do/z PSD synaps pobudzających. **B.** Przejściowe wzmożone usuwanie PSD-95 w czasie LTP i otwarcie kanałów receptorów NMDA powoduje translokację CaMKII do PSD i stymuluje tworzenie kompleksu stymulującego wzrost kolca. Działanie tego kompleksu wymaga obecności PSD-95, ponieważ brak tego białka lub jego uszkodzenie poprzez mutacje końców -N' lub -C' upośledza wzrost kolców dendrytycznych. Aktywacja CaMKII i prawdopodobnie innych CaMK indukują transport PSD-95 w stronę błony postsynaptycznej, po którym następuje zwiększenie PSD kolca dendrytycznego i jego stabilny wzrost (Lee i in., 2009; Matsuzaki i in., 2004). Zwykle proces ten jest przerywany i odwracany przez zależną od CaMKII fosforylację PSD-95 na poziomie seryny 73, co prowadzi do rozłączenia białek kompleksu zagęszczenia postsynaptycznego, m.in. PSD-95 i ich transportu poza kolce (Steiner i in., 2008). **C.** Zablockowanie translokacji PSD-95 z PSD, w efekcie spowodowałoby prawdopodobnie zwiększenie stabilności synapsy i wzmożony wzrost kolca dendrytycznego.

1.5.2.2. Zaburzenia poziomu ekspresji PSD-95 i jego skutki

PSD-95 reguluje dojrzewanie synaps, stabilizację i organizację białek PSD, w tym receptorów glutaminianu (Kim i Sheng, 2004). Odgrywa ono również rolę w LTP, kotwiczony receptory AMPAR oraz w LTD, poprzez interakcje z receptorami NMDAR (Xu i in., 2008). Obniżenie poziomu białka PSD-95, jak również białek PSD-93

czy SAP-102, prowadzi do zmniejszenia się PSD oraz obniżenia transmisji synaptycznej zależnej od receptorów AMPA i NMDA (Beique i in., 2006; Chen i in., 2011, 2015; Migaud i in., 1998). Myszy pozbawione białka PSD-95 charakteryzują się zarówno trudnościami w nauce przestrzennej odnajdywania ukrytej platformy w labiryncie wodnym Morrisa, nie redukując długości pokonywanej trasy w kolejnych sesjach, a także wykazują zwiększone LTP i osłabione LTD (Migaud i in., 1998). Wyniki te potwierdzono również w eksperymentach *in vitro* w neuronach hipokampalnej hodowli organotypowej lub neuronach hodowli dysocjowanej z obniżonym poziomem PSD-95 (Ehrlich i in., 2007; Xu i in., 2008). W celu zminimalizowania kompensacji niedoborów PSD-95 w komórce innymi MAGUK, stworzono transgeniczne myszy typu knock-in (KI) u których domeny PDZ1/2 PSD-95 nie są w stanie wiązać ligandów, ale zachowują swoją ogólną strukturę (Nagura i in., 2012). Niemniej jednak, myszy KI wykazywały obniżony poziom PSD-95, PSD-93 i podjednostek AMPAR, ale zwiększony poziom SAP102 w PSD. Podobnie jak w przypadku typowych nokautów, obserwowano znacznie wzmocnione LTP w hipokampie, a behawioralna charakterystyka potwierdziła upośledzenie pamięci przestrzennej w teście okrągłego labiryntu Barnes i 8-ramiennym labiryncie promienistym oraz wykazała upośledzone formowanie pamięci strachu zależne od kontekstu. Ponadto, myszy KI charakteryzowały się hiperaktywnością, wzmożonym zachowaniem związanym ze stresem w nowym środowisku oraz obniżoną częstością interakcji społecznych ze współdomownikami w klatce domowej. Myszy pozbawione PSD-95 wykazują silne upośledzenie warunkowania awersji smaku. W apetytywnym warunkowaniu preferencji miejsca z etanolem myszy te uczyły się położenia etanolu, ale z czasem unikały tego miejsca (Camp i in., 2011). Oprócz uczenia się apetytywnego, PSD-95 zaburza również funkcję układu nagrody, wywołując uwrażliwienie na psychostymulanty. Lokalne obniżenie poziomu białka PSD-95 w jądrze półleżącym lub skorupie ogoniastej nasila ostre, stymulujące działanie kokainy wywołując zwiększoną aktywność lokomotoryczną (Yao i in., 2004). Brak PSD-95 nasila zachowania lękowe i, co ciekawe, skutkuje wzmocnionymi interakcjami społecznymi (Feyder i in., 2010). W związku z tym, białka MAGUK najprawdopodobniej nie przyczyniają się do współwystępowania lęku i deficytów społecznych w zaburzeniach ze spektrum autyzmu, jak pierwotnie twierdzono. Zmienność ludzkiego genu *Dlg4* kodującego PSD-95 została powiązana z fenotypem

związanym z zaburzeniami ze spektrum autyzmu i zespołem Williamsa (Feyder i in., 2010), podczas gdy obniżony poziom PSD-95 i podjednostek GluN2A i GluN2B receptora NMDA w korze przedczołowej był obserwowany u pacjentów z kliniczną depresją (Feyissa i in., 2009).

Podwyższony poziom białka PSD-95 nasila z kolei transmisję synaptyczną, obniża LTP i pogłębia LTD (Stein i in., 2003). Nadprodukcja PSD-95 promuje tworzenie synaps pobudzających oraz skutkuje zwiększeniem wielkości kolców dendrytycznych i PSD, podobnie jak w przypadku LTP (El-Husseini i in., 2000). W skrawkach hipokampalnej hodowli organotypowej *in vitro*, wzrost poziomu PSD-95 sprzyjał powstawaniu bardzo dużych zagęszczeń postsynaptycznych i tworzeniu kolców dendrytycznych o złożonym unerwieniu (MIS) (Nikonenko i in., 2008). Zgodnie z deficytami pamięci obserwowanymi w modelach mysich, PSD-95 jest zaangażowane w progresję choroby Alzheimera w oparciu o istotną negatywną korelację między poziomem białka w korze skroniowej i w korze czołowej, a nasileniem objawów choroby (Proctor i in., 2010). W korze czołowej tych pacjentów obserwowano znaczne podwyższenie poziomu PSD-95 (Leuba i in., 2008a).

Warto podkreślić, że szeroko zbadano wpływ zmian ekspresji PSD-95 na zaburzenia plastyczności synaptycznej, które dotychczas testowano zarówno w modelach *in vitro*, jak i w doświadczeniach na zwierzętach, w których łączono zmiany molekularne ze zmianami w zachowaniu. Analizując funkcje modyfikacji potranslacyjnych tego białka, dostępne są doniesienia na temat zmian zachodzących *in vitro* na poziomie komórki czy struktury synapsy, ale brakuje badań na temat znaczenia tych procesów na poziomie systemowym, mającym odzwierciedlenie w zachowaniu zwierząt. Dlatego też, poruszana tematyka w powyższej rozprawie o funkcji fosforylacji PSD-95 w wyborze przestrzennym, stanowi nowe i oryginalne podejście w badaniach neuronauk.

1.6. Zmiany strukturalne i funkcjonalne związane z procesem starzenia

Wraz z rozwojem cywilizacji odsetek ludzi starszych (> 65 lat) w społeczeństwie szybko rośnie. Jest to skutek postępu medycyny i poprawy jakości życia. Prognozy wskazują, że do 2050 r. liczba osób w wieku powyżej 60 lat wzrośnie dwukrotnie w porównaniu do roku 2015 i wyniesie około 2 miliardy co będzie

stanowiąc 22% światowej populacji (World Population Ageing 2015, 2015). Dlatego też rozumienie mechanizmów powstawania pamięci w kontekście procesu starzenia jest niezwykle ważne.

1.6.1. Pogorszenie zdolności poznawczych i pamięci przestrzennej

Towarzyszące starzeniu zjawiska upośledzenia funkcji poznawczych i demencja stają się globalnym problemem i przewiduje się, że ich częstość będzie rosła w szczególności w rozwijających się regionach świata (Ferri i in., 2005; Geneva: The World Health Organization, 2008; Ineichen, 2000; Mathers i Loncar, 2002). W przypadku problemów z pamięcią u osób starszych w pierwszej kolejności pojawia się osłabienie pamięci krótkotrwałej, podczas gdy pamięć długotrwała może pozostać nienaruszona. Pogorszenie pamięci jest naturalną konsekwencją fizjologicznego starzenia się układu nerwowego (ang. *age-associated memory impairment, AAMI*) (Kral, 1962, 1958) pod warunkiem, że nie zakłóca ona w znaczny sposób codziennego życia, zdolności wykonywania zadań oraz uczenia się lub zapamiętywania nowych rzeczy, co zwykle towarzyszy starzeniu patologicznemu (Crook i in., 1986).

Zdolności poznawcze u ludzi zależą od: szybkości przetwarzania informacji, percepcji, uwagi, pamięci, języka, zdolności wzrokowo-przestrzennych oraz funkcji wykonawczych (Harada i in., 2013). Podobnie, zachowanie zwierząt opiera się na uwadze i różnych rodzajach pamięci. Pogorszenie funkcji poznawczych związane z wiekiem koreluje z zaburzeniem koordynacji ruchowej zarówno zwierząt, jak i ludzi, którzy tracą niezależność i doświadczają pogorszenia jakości życia. Starzejące się osobniki wykazują również wyraźne deficyty w przestrzennych zadaniach pamięciowych. Potrzebują więcej prób do zapamiętania położenia, a także charakteryzują się szybszym zapominaniem i zagubieniem w znanym środowisku w labiryncie T i Y, labiryncie ramion promienistych, basenie wodnym Morrisa, wodnym labiryncie ramion promienistych, czy w labiryncie Barnes (m.in. Aggleton i in., 1989; Barnes, 1979; Barnes i in., 1980, 1990; Barnes i McNaughton, 1986; Barrett i in., 2009; Bimonte i in., 2003; Gallagher i in., 1993; Luine i Hearn, 1990; Markowska i in., 1989; McQuail i Nicolle, 2015; Ménard i Quirion, 2012; Mizumori i in., 1996; Rosenzweig i in., 1997; Shen i in., 1997).

Upośledzenie funkcji poznawczych wraz z postępującym procesem starzenia, związane jest ze zmianami w ośrodkowym układzie nerwowym, głównie w korze przedczołowej i hipokampie. Zmiany te mogą prowadzić do rozwoju nie tylko chorób neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, ale także chorób psychicznych, np. depresji i schizofrenii (Baker i Petersen, 2018). Niemniej jednak, zgodnie z ideą kontinuum procesu starzenia się (Franceschi i in., 2018), fizjologiczne starzenie się, wolne od upośledzenia umysłowego staje się poważnym problemem zdrowia publicznego, w miarę wzrostu odsetka osób starszych w populacji na całym świecie (Geneva: The World Health Organization, 2008). W czasie normalnego starzenia się, zwykle obserwuje się subtelne zmiany neurologiczne związane z wiekiem w porównaniu do zmian obserwowanych w zaburzeniach neurodegeneracyjnych. Ponadto, zrozumienie zmian poznawczych związanych z wiekiem stanowi tło, na którym można ocenić skutki patologicznych stanów chorobowych.

1.6.2. Wpływ procesu starzenia na anatomię hipokampa

W procesie starzenia obserwuje się zmniejszenie objętości mózgu, zarówno u ludzi (Driscoll i in., 2009, 2003; Freeman i in., 2008; Raz i in., 2010), jak i szczurów (Driscoll i in., 2006; Rapp i in., 1999), któremu towarzyszy pogorszenie funkcji poznawczych związanych ze zmianami plastyczności neuronalnej lub zmianami komórkowymi bezpośrednio wpływającymi na mechanizmy plastyczności. Jako że, hipokamp wraz z korą przedczołową są krytycznymi regionami mózgu dla zdolności poznawczych, są one szeroko zbadane w kontekście zmian związanych ze starzeniem. Niedoborom kognitywnym towarzyszą subtelne zmiany anatomiczne, które mają różny przebieg w poszczególnych regionach hipokampa. Ze względu na tematykę rozprawy i zakres badań, w tym rozdziale omówię podstawowe zmiany strukturalne i funkcjonalne obserwowane w regionie dCA1 hipokampa u starzejących się osobników, które mogą przyczyniać się do selektywnych zaburzeń poznawczych występujących w podeszłym wieku.

Wydaje się, że neurony ludzkiego hipokampa zachowują swój rozmiar i złożoność drzewa dendrytycznego przez całe życie (Flood, 1993; Hanks i Flood, 1991). Wyniki badań na innych modelach zwierzęcych są niejednoznaczne pod

względem kierunku zachodzących zmian i potwierdzają brak znaczących zaburzeń w obrębie dendrytów. Nie obserwuje się zmniejszenia długości dendrytów dCA1 wraz z wiekiem, a wręcz istnieją badania sugerujące, że niewielka populacja neuronów w tym regionie hipokampa może ulegać zwiększonemu rozgałęzieniu się i wydłużeniu w procesie starzenia (Pyapali i Turner, 1996; Turner i Deupree, 1991).

Zarówno gęstość, jak i morfologia kolców dendrytycznych mogą ulegać zmianom związanym z wiekiem, lecz wydaje się że morfologia neuronów hipokampa jest bardziej stabilna niż neuronów korowych. Liczba kolców dendrytycznych w szczurzym i ludzkim regionie CA1 hipokampa, na ogół pozostaje niezmienną wraz z wiekiem (Alcantara-Gonzalez i in., 2010; Dickstein i in., 2013; Markham i in., 2005). Obserwowano natomiast, zmniejszenie obszaru zagęszczenia postsynaptycznego w dojrzałych i stabilnych kolcach z perforowanym PSD u starzejących się szczurów, co korelowało z ich trudnościami w uczeniu się (Nicholson i in., 2004). Potwierdza to hipotezę, że wiele perforowanych synaps hipokampa staje się нефunkcjonalnych lub cichych u starszych szczurów charakteryzujących się trudnościami w uczeniu się, a utrata funkcjonalnych synaps może przyczyniać się do pogorszenia funkcji poznawczych w czasie normalnego starzenia się. Co więcej, badania elektrofizjologiczne popierają to odkrycie. Zmniejszona amplituda pobudzającego potencjału postsynaptycznego (EPSP, ang. *excitatory postsynaptic potential*) synaps w obszarze CA1, bez zmian w jednostkowym EPSP oraz amplitudzie w kolateralach Schaffera, wskazuje na utratę funkcjonalnych synaps w CA1 wraz z wiekiem (Barnes i in., 1992, 2000).

1.6.3. Zmiany w neuronalnej plastyczności funkcjonalnej

1.6.3.1. Wpływ procesu starzenia na strukturę i funkcję receptorów NMDA

Skutki zmienionej morfologii oraz zaburzeń połączeń synaptycznych na plastyczność starzejących się neuronów, można ocenić mierząc zmiany w LTP i LTD. Pomiar elektrofizjologiczne w skrawkach *ex vivo* wykazały, że indukcja LTP w komórkach CA1 jest upośledzona tylko w przypadku zastosowania słabszego bodźca. W przypadku silniejszej stymulacji, LTP w hipokampie starych zwierząt jest wywoływane w podobnym stopniu jak to mierzone u młodych zwierząt, co sugeruje wyższy próg wejścia w fazę indukcji LTP w starzejących się komórkach CA1 (Liffield

i in., 1978). Zjawisko to można wyjaśnić rozregulowaniem homeostazy Ca^{2+} (Toescu i in., 2004), wynikającym ze zwiększonej przepuszczalności synaptycznych kanałów wapniowych typu L w starzejących się neuronach (Thibault i Liffield, 1996). Podwyższony wewnątrzkomórkowy poziom jonów Ca^{2+} powoduje aktywację kanałów potasowych odpowiedzialnych za późniejszy potencjał hiperpolaryzacyjny (AHP), który następuje po wyładowaniu potencjałów czynnościowych (Kerr i in., 1989; Liffield i Pitler, 1984). W dłuższej perspektywie może to skutkować zwiększonym prawdopodobieństwem indukcji LTD i upośledzeniem fazy utrzymania LTP (Thibault i Liffield, 1996).

Neurotransmisja glutaminianergiczna jest związana z homeostazą Ca^{2+} oraz działaniem receptorów NMDA. Badania fizjologiczne konsekwentnie wskazują, że pobudzające potencjały postsynaptyczne, w których pośredniczy receptor NMDA w hipokampalnym szlaku biegnącym przez kolaterale Schaffera, są zmniejszone o około 50–60% u starszych zwierząt (Barnes i in., 1997; Billard i Rouaud, 2007; Bodhinathan i in., 2010; Brim i in., 2013; Eckles-Smith i in., 2000; Kumar i in., 2018; Kumar i Foster, 2013; Lee i in., 2014).

Potencjalnym mechanizmem obserwowanego osłabienia funkcji receptora NMDA może być zmiana ekspresji podjednostek NMDAR (Magnusson, 2000). Wraz z wiekiem obserwuje się w hipokampie istotne obniżenie poziomu białka GluN1 (Coultrap i in., 2008; Eckles-Smith i in., 2000; Liu i in., 2008; Magnusson i in., 2002) oraz ekspresji mRNA tej podjednostki (Adams i in., 2001; Magnusson, 2000). Z kolei inne badania wskazują na nieistotne obniżenie poziomu białka GluN1 wraz z wiekiem lub nawet zupełny brak zmian jego poziomu w całym hipokampie (Sonntag i in., 2000; Zhao i in., 2009).

Podjednostka GluN2B jest silnie wyrażana w mózgu na wczesnych etapach rozwoju i obniża się z początkiem dojrzałości płciowej, podczas gdy ilość podjednostki GluN2A wzrasta wraz z wiekiem (Laurie i in., 1997; Laurie i Seeburg, 1994; Law i in., 2003a, 2003b; Liu i in., 2004; Monyer i in., 1994). Uważa się, że ilościowa zmiana w podjednostkach GluN2A i GluN2B w hipokampie przyczynia się do rozwojowych zmian poznawczych i funkcji synaptycznych (Dumas, 2005). Podjednostka GluN2A receptora NMDA ulega silnej ekspresji w hipokampie i innych regionach mózgu. Starzenie się wiąże się z brakiem zmian lub niewielkim obniżeniem ekspresji mRNA GluN2A w hipokampie (Magnusson, 2000, 2001; Magnusson i in.,

2006). Konsekwentnie, obserwowano również zmniejszoną ilość białka GluN2A w hipokampie starszych zwierząt w porównaniu ze zwierzętami w średnim wieku (Magnusson i in., 2002). Istnieją jednak również badania wskazujące na brak zmiany ilościowej związanej z wiekiem w podjednostce GluN2A w hipokampie (Clayton i in., 2002; Clayton i Browning, 2001; Mesches i in., 2004).

W przeciwieństwie do GluN2A, jednoznacznie stwierdza się, że poziom białka GluN2B (Clayton i Browning, 2001; Coultrap i in., 2008; Liu i in., 2008; Magnusson i in., 2002; Mesches i in., 2004; Sonntag i in., 2000; Zhao i in., 2009) i ekspresja mRNA GluN2B (Clayton i Browning, 2001; Magnusson, 2000, 2001; Magnusson i in., 2006; Márquez Loza i in., 2017) spada w hipokampie w zaawansowanym wieku. Jednym z problemów jest to, że niewiele badań dotyczyło ekspresji obu podjednostek u tego samego zwierzęcia. Z badań w których analizowano udział obu podjednostek u jednego osobnika wynika, że zmniejszona ekspresja, głównie GluN2B, zwiększa stosunek białka GluN2A/GluN2B w kilku obszarach mózgu (Clayton i Browning, 2001; Magnusson i in., 2007; Mesches i in., 2004). Istnieją jednak doniesienia, które wskazują, że obie podjednostki słabną w równym stopniu z wiekiem (Magnusson i in., 2002; Sonntag i in., 2000). Zmniejszeniu poziomu podjednostek GluN2A i GluN2B towarzyszy zmiana lokalizacji GluN2B z synapsy do miejsc pozasynaptycznych (Potier i in., 2010). Zmniejszenie wychwyty glutaminianu jest związane z pozasynaptycznymi receptorami NMDA w synapsach CA1 hipokampa u szczurów w podeszłym wieku (Potier i in., 2010). Niedawno opisano, że aktywacja pozasynaptycznych receptorów NMDA indukuje nadekspresję białka tau (Sun i in., 2016). Ze względu na obecność podjednostki GluN2B w pozasynaptycznych receptorach NMDA (Rammes i in., 2017), została ona uznana za potencjalny cel w leczeniu zaburzeń neurodegeneracyjnych związanych ze starzeniem, takich jak choroba Alzheimera.

1.6.3.2. Zaburzenia w poziomie PSD-95 w starzejących się neuronach hipokampa

Białka synaptyczne są ważnymi markerami molekularnymi w procesie starzenia się mózgu. PSD-95 znane ze swojej roli w regulacji plastyczności synaptycznej i szlaków sygnałowych jest dobrym markerem reprezentującym postępującą degenerację i zaburzenia transmisji synaptycznej. Nadmiar lub niedobór

tego białka zaburza jego fizjologiczną funkcję (Migaud i in., 1998). W stanach patologicznych jak choroba Alzheimera obserwuje się zwiększoną ilość białka PSD-95 w neuronach (Leuba i in., 2008a, 2008b, 2014), podczas gdy w starzeniu fizjologicznym poziom tego białka różni się zależności od badanego regionu mózgu. Hipokamp, w przeciwieństwie do np. kory nowej, i w zależności od zastosowanej techniki badawczej, wraz z wiekiem wykazuje stabilną lub obniżoną ilość PSD-95 przy niezmiennym poziomie ekspresji mRNA (Counts i in., 2014; Preissmann i in., 2012; Proctor i in., 2010; Rogers i in., 2017; Sultana i in., 2010; VanGuilder i in., 2011). Rozbieżności w jednoznacznym wnioskowaniu co do kierunku zmian ilości PSD-95 w hipokampie wraz z wiekiem, mogą odzwierciedlać postęp zmian patologicznych. Obserwowano wysoką negatywną korelację między ilością PSD-95, a dokładnością w dokonywaniu wyborów przestrzennych (Preissmann i in., 2012).

Podsumowując, proces starzenia powoduje kurczenie się synaps i zaburzenie ich funkcji w polu CA1. Ciągłe jednak nie wiemy w jaki sposób starzenie wpływa na mechanizmy komórkowe leżące u podstaw procesów poznawczych zależnych od CA1. Ich zrozumienie jest niezbędne do opracowania nowych strategii terapeutycznych wspierających proces starzenia.

2. Cele pracy

Obszar CA1 grzbietowej części hipokampa (dCA1) jest kluczową strukturą umożliwiającą dokonania wyboru przestrzennego, czyli wyboru wykorzystującego informacje przestrzenne do powstrzymywania niewłaściwych zachowań (Bannerman i in., 2012, 2014). **Głównym celem niniejszej pracy było określenie w jaki sposób starzenie się wpływa na strategie behawioralne i procesy synaptyczne w dCA1, które wspierają dokonywanie wyborów przestrzennych.**

W ramach realizacji głównego celu, sformułowano szereg szczegółowych problemów badawczych:

1. Charakterystyka strategii behawioralnych wspomagających decyzje przestrzenne w podeszłym wieku.
2. Charakterystyka zmian synaptycznych w dCA1 towarzyszących podejmowaniu decyzji przestrzennych w podeszłym wieku.
3. Rola białka PSD-95 w dCA1 i fosforylacji reszty serynowej 73 PSD-95, w podejmowaniu decyzji przestrzennych.

Praca ta ma na celu poszerzenie wiedzy na temat molekularnych i komórkowych mechanizmów plastyczności synaptycznej i decyzji przestrzennych w dorosłym oraz starzejącym się mózgu.

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach

W doświadczeniach wykorzystano transgeniczne myszy szczepu Thy1-GFP linii M (Tg(Thy1-EGFP)MJs/J) (Feng i in., 2000) z hodowli Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN oraz myszy ze szczepu wsobnego C57BL/6cmdb zakupione w Centrum Medycyny Doświadczalnej w Białymstoku.

Doświadczenia prowadzono w klatkach IntelliCage, w których zwierzęta żyją w grupie. Ze względu na wzmożoną agresję samców i ich silne zachowania hierarchiczne, badania przeprowadzono wyłącznie na samicach. W momencie rozpoczęcia doświadczeń młode dorosłe myszy były w wieku 5 ± 1 miesięcy (nazywane dalej *młodymi*), a osobniki stare miały 18 ± 2 miesięcy (grupa myszy *starych*). Tło genetyczne szczepu Thy1-GFP stanowią szczepy C57BL/6J i CBA (Feng i in., 2000), a dla odnowienia hodowli zwierzęta krzyżowano z myszami ze szczepu wsobnego C57BL/6cmdb. W hodowli kojarzono zwierzęta heterozygotyczne (Thy1-GFP $^{+/-}$) i typu dzikiego (Thy1-GFP $^{-/-}$), a w doświadczeniach użyto potomstwa Thy1-GFP $^{+/-}$. Myszy tej linii posiadają zmodyfikowany region regulatorowy genu *thy1.2* co pozwala na selektywną ekspresję białka fluorescencyjnego GFP w części komórek mózgu. Poprzez eliminację eksonu 3 i flankujących intronów przed sekwencją białka zielonej fluorescencji (GFP), gen *thy1.2* stał się specyficznym dla neuronów (Feng i in., 2000).

Do genotypowania zwierząt używano tkanki pobranej z ogona od 21-dniowych myszy. Genomowe DNA otrzymywano poprzez całonocną inkubację tkanki w 55°C w buforze do lizy (skład buforu: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS, proteinaza K 1:10), a następnie dezaktywację procesu w 98°C przez 10 minut (dezaktywacja działania proteinazy K). 3 μl uzyskanego lizatu dodano do 120 μl buforu TE (skład: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) i tak przygotowany materiał DNA wykorzystano w reakcji PCR (z ang. *polymerase chain reaction*). W mieszaninie reakcyjnej używano dwóch par starterów (syntetyzowanych w firmie Genomed S. A.) o sekwencjach przedstawionych w **Tabeli 1**. Pozostałe składniki wchodzące w skład reakcji wyszczególniono w **Tabeli 2**. Reakcję prowadzono w termocyklerze Labcycler48 firmy SensoQuest według programu przedstawionego w **Tabeli 3**.

Tabela 1. Startery do reakcji PCR.

Starter	Sekwencja 5' -> 3'	Typ startera
15731	CGG TGG TGC AGA TGA ACT T	Starter wsteczny (ang. <i>reverse</i>)
16072	ACA GAC ACA CAC CCA GGA CA	Starter przedni (ang. <i>forward</i>)
oIMR7338	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Wewnętrzna kontrola pozytywna; starter przedni
oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	Wewnętrzna kontrola pozytywna; starter wsteczny

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

Składnik	Stężenie końcowe	Objętość
bufor Kapa 2G HS	1,3 x	5 µl
MgCl ₂	2,6 mM	0,5 µl
dNTP KAPA	0,26 µM	0,5 µl
Starter 15731	0,5 µM	1,25 µl
Starter 16072	0,5 µM	1,25 µl
Starter oIMR7338	0,5 µM	1,25 µl
Starter oIMR7339	0,5 µM	1,25 µl
Polimeraza Kapa 2G HS tag polym	0,03 U/µl	0,1 µl
ddH ₂ O		11,9 µl
DNA		2 µl

Tabela 3. Cykle reakcji PCR.

Krok	Temperatura (°C)	Czas (sek.)	Uwagi
1.	94	120	
2.	94	20	
3.	65	15	Obniżenie o 0,5 °C w każdym cyklu
4.	68	10	
5.	-	-	10x powtórzenie etapu 2-4
6.	94	15	
7.	60	15	
8.	72	10	
9.	-	-	28x powtórzenie etapu 6-8
10.	72	120	
11.	4	-	utrzymanie

W wyniku reakcji PCR z DNA otrzymywano produkt o długości 415 pz oraz produkt będący pozytywną kontrolą o długości 324 pz. Produkty te były identyfikowane techniką elektroforezy w żelu agarozowym (1,2-2% agarosa (Sigma-

Aldrich) w buforze TBE (Sigma-Aldrich)) z barwnikiem Midori Green Advance DNA Stain (ABO) przy napięciu prądu 100 V. Do próbki z produktem PCR dodawano 5 µl buforu obciążającego. Do studzienek wprowadzano 15 µl mieszaniny reakcyjnej. Po zakończeniu migracji żel fotografowano w transluminatorze (Syngene).

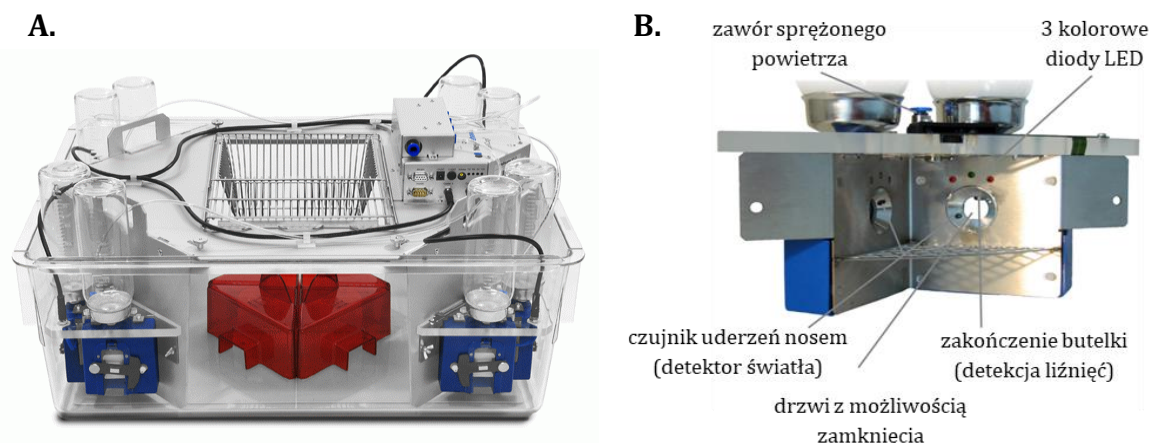
Myszy przetrzymywano i hodowano w pomieszczeniach o stałym cyklu dobowym (12 godzin fazy jasnej, 12 godzin fazy ciemnej), stałej temperaturze (23-24°C) i wilgotności (35-45%). Zwierzęta miały Nielimitowany dostęp do wody oraz standardowej karmy dla gryzoni laboratoryjnych (Labofeed B standard). Wszystkie procedury doświadczalne zostały przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi regulacjami i za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr. 247/2012, 829/2019). Dołożono wszelkich starań aby zredukować liczbę zwierząt użytych w doświadczeniach i zminimalizować ich cierpienie.

3.2. Test preferencji/unikania miejsca w klatkach IntelliCage

3.2.1. System IntelliCage

System IntelliCage firmy NewBehavior AG (Zürich, Szwajcaria; <http://www.newbehavior.com/>) umożliwia długotrwałe, w pełni zautomatyzowane monitorowanie zachowania myszy żyjących w grupach społecznych (do 15 osobników) przy minimalizacji wpływu badacza i stresu. System składa się z dużej plastikowej klatki (o wymiarach u podstawy: 55 cm x 37,5 cm; na szczycie: 58 cm x 40 cm i wysokości 20,5 cm) oraz elektronicznej pokrywy podłączonej do komputera rejestrującego dane w systemie ciągłym (**Rycina 5A**). Klatka wyposażona jest w cztery komory instrumentalne umieszczone w narożnikach (**Rycina 5B**). W każdym rogu klatki IntelliCage można umieścić dwie butelki z płynem. Aby uzyskać dostęp do komory mysz przechodzi przez tunel (wejście do tunelu o wymiarach: zewnętrzna średnica otworu: 50 mm; wewnętrzna średnica: 30 mm; głębokość otworu: 20 mm) w którym antena rejestruje i identyfikuje osobnika dzięki wszczepionemu podskórnie transponderowi (Slim Microchip TSL, Datamars). Takie rozwiązanie pozwala na całodobową rejestrację informacji o liczbie i długości wizyt w rogach, uderzeń nosem w drzwi i liźnięć butelki. Komory klatki zaprojektowano

tak, aby mogła zmieścić się w nich tylko jedna mysz, co gwarantuje precyzję rejestrowanych danych i ich właściwe przypisanie dla każdego z osobników. W opisanych doświadczeniach używano dwóch aktywnych rogów, a dwa pozostałe narożniki były niedostępne dla myszy. W każdym rogu były umieszczone dwie butelki z płynem. Dostęp do butelek był ograniczony przez automatycznie zamykane drzwi, które zwierzę mogło otworzyć poprzez uderzenie w nie nosem.



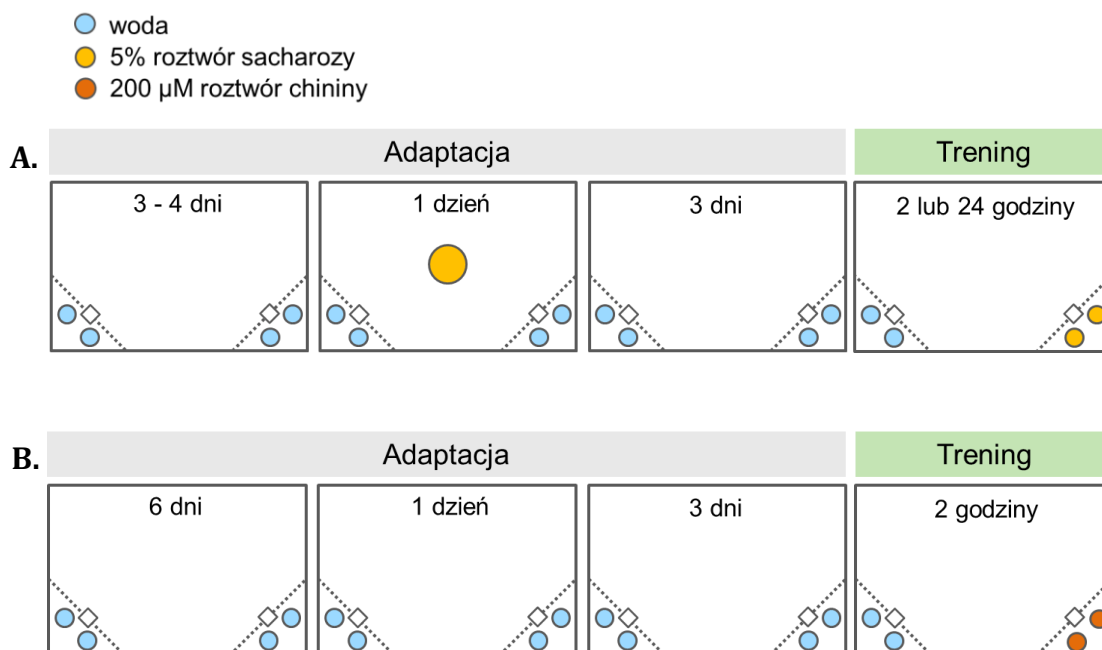
Rycina 5. System IntelliCage. **A.** Klatka IntelliCage z widocznymi czterema aktywnymi rogami (w kolorze niebieskim), połączonymi z panelem rejestrującym (szara pokrywa). W pokrywce znajduje się metalowa kratka na pokarm, a wewnątrz klatki czerwone domki dla myszy. **B.** Komora instrumentalna (róg) widoczna od wnętrza klatki (z perspektywy zwierzęcia). Mysz po przejściu przez tunel ma do wyboru dwa otwory za którymi znajdują się automatycznie zamykane drzwi, a za nimi dostępne butelki. Nad każdym otworem znajdują się trzy kolorowe diody LED, których selektywna aktywność może być zaprojektowana przez badacza.

Trzy dni przed rozpoczęciem doświadczenia myszy zostały poddane procedurze podskórnego wszczepienia transponderów (10,9 mm długości; 1,6 mm średnicy; Slim Microchip TSL, Datamars) umożliwiających identyfikację zwierząt w klatkach IntelliCage. Zabieg wykonano w krótkotrwałej anestezji wziewnej (0,5% izofluranu we wdychanym powietrzu, Iso-Vet).

3.2.2. Trening w klatce IntelliCage

Testy preferencji lub unikania miejsca składały się z dwóch etapów: adaptacji (7-11 dni) i treningu (2 lub 24 godziny) (**Rycina 6**). W trakcie adaptacji zwierzęta mogły swobodnie eksplorować rogi klatki w których miały dostęp do wody. Cztery

dni przed treningiem, od góry klatki, udostępniono myszom na 24 godziny butelkę z 5% roztworem sacharozy (obj. 250 ml) (Sigma-Aldrich) dla zapoznania się ze słodkim smakiem cukru (**Rycina 6A**).



Rycina 6. Schemat treningu apetytywnego (A) i awersyjnego (B) w klatce IntelliCage.

Podstawowa preferencja rogów została określona na podstawie pomiarów z ostatniej doby adaptacji i przedstawiono ją jako procentowy udział wizyt lub liźnięć z mniej uczęszczanego rogu klatki. W tym rogu, w fazie treningu umieszczono butelkę z 5% roztworem sacharozy. W treningu awersyjnym, woda w preferowanym rogu klatki została zastąpiona 200 μ M roztworem chininy (Sigma-Aldrich) (**Rycina 6B**). Zmianę preferencji rogu (Δ) z roztworem sacharozy lub chininy podczas treningu (% wizyt do rogu z sacharozą/chinina), porównano do preferencji tego samego rogu w ostatnim dniu adaptacji (A) i zdefiniowano jako miarę dokonanego **wyboru przestrzennego**. Wszystkie etapy doświadczenia rozpoczynały się z początkiem fazy ciemnej gdy wzrasta aktywność myszy.

Interakcje społeczne w klatce IntelliCage, zbadalam metodą analizy wizyt bliskich. Wizyty bliskie definiowałam jako wizyty rozpoczynające się w momencie zakończenia wizyty innej myszy w tym samym rogu lub w czasie nie dłuższym niż 1 sekunda (< 1 sek.) od poprzedniej wizyty (Dzik, 2018; Dzik i in., 2018; Harda i in.,

2018) (PyMICE software, RRID: SCR_010505). Metoda ta pozwala określić tendencję zwierząt do podążania za sobą. W celu określenia częstości wizyt **patrolujących**, analizowano % wizyt bez picia płynów pośród wszystkich wizyt wykonanych przez zwierzę. Natomiast mianem **perseweracji** określono % wizyt do rogu, który zwierzę preferowało bardziej w czasie adaptacji.

3.3. Perfuzja przezsercowa

W celu pobrania tkanki i wykonania barwienia immunofluorescencyjnego *ex vivo*, myszy znieczulono dootrzewnowym zastrzykiem ketaminy (w dawce 65 mg/kg), a następnie usypiano dootrzewnowym zastrzykiem pentobarbitalu sodu (50 mg/kg). Zwierzę perfundowano umieszczając w lewej komorze serca igłę i rozcinając prawy przedsionek. Następnie, przez 3 minuty podawano przefiltrowany, zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS, Medicago, #09-9400-100), a po nim 4% roztwór paraformaldehydu (PFA, Sigma-Aldrich, #441244) w PBS (pH 7,5) przez 6 minut. Oba roztwory były schłodzone do temperatury 4°C. Wyizolowane mózgi utrwalano dodatkowo w 4% roztworze PFA w PBS w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Następnie tkankę przełożono do 30% roztworu sacharozy (POCH, #772090110) w PBS o charakterze krioprotekcyjnym i trzymano 3 dni w 4°C. Mózgi krojono na kriostacie żyłkowym (CM1950, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Niemcy) w płaszczyźnie czołowej, na skrawki o grubości 40 µm. Skrawki przechowywano w temperaturze -20°C w roztworze krioprotekcyjnym (PBS, 15% sacharoza (POCH, #772090110), 30% glikol etylenowy (BioShop, #ETH001.4), 0,05% NaN₃ (POCH, #792770426)).

3.4. Barwienie immunofluorescencyjne

Do wykonania barwień immunofluorescencyjnych wybrano co szósty skrawek mózgu zawierający grzbietową część hipokampa. Skrawki zidentyfikowano na podstawie mysiego atlasu mózgu (Paxinos i Franklin, 2001) i wybrano takie, które znajdowały się w przedziale koordynatów w osi przednio-tylnej (AP) pomiędzy -1,70 mm do -2,06 mm od punktu bregmy. W dniu barwienia skrawki wypłukano 3 x 6 minut w PBS i inkubowano w roztworze blokującym składającym się z 5% roztworu surowicy oślej (NDS, Jackson ImmunoResearch, #017-000-121; RRID:

AB_2337258) i 0,3% Triton X-100 (BioShop, #TRX506.100) w PBS przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, aby zminimalizować niespecyficzne wiązanie przeciwciał. Następnie, skrawki inkubowano przez noc w 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem rozpoznającym antygeny białka PSD-95 (1:500, Merck-Millipore, #MAB1598; RRID: AB_94278). Drugiego dnia skrawki wypłukano 3 x 6 minut w 0,3% roztworze Triton X-100 w PBS i inkubowano przez 1,5 godziny z przeciwciałem drugorzędowym Alexa Fluor 555 (1:500, Invitrogen, #A31570; RRID: AB_2536180). Po inkubacji skrawki przepłukano 3 x 6 minut w PBS, nałożono na szkiełka (Thermo Scientific, #AGAA000080) i zamknięto w medium Fluoromount-G z barwnikiem DAPI (Invitrogen, #00-4959-52).

3.5. Stereotaktyczne iniekcje wektorów wirusowych

Samicę myszy wprowadzono w stan znieczulenia ogólnego za pomocą wziewnego anestetyku, izofluranu (Aerrane, Baxter; 5% indukcja, 1,5-2% w trakcie operacji), i umieszczono w ramie stereotaktycznej (#51503, Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Zwierzę otrzymało podskórny zastrzyk: butorfanolu (2 mg/kg, Butomidor, Richter Pharma) o działaniu przeciwbólowym, kwasu tolfenamowego (4 mg/kg, Tolfedine, Vetoquinol) o charakterze przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym oraz antybakteryjną enrofloksacynę (10 mg/kg, Baytril, Bayer). Wszystkie roztwory z substancjami aktywnymi zostały przygotowane w soli fizjologicznej (0,9% NaCl, Gilbert). Temperatura ciała zwierzęcia podczas operacji była utrzymywana za pomocą maty grzewczej. Na oczy myszy zaaplikowano nawilżający żel z karbomerem (2 mg/g, Vidisic, Bausch&Lomb), a skórę głowy ogolono i miejscowo zdezynfekowano roztworem 70% alkoholu etylowego. Iniekcję stereotaktyczną wykonano do każdej z dwóch półkul mózgu, do grzbietowej części hipokampa pola CA1 (dCA1), według koordynatów wyznaczonych na podstawie atlasu mózgu myszy (Paxinos i Franklin, 2001): AP, -2,1 mm; ML, $\pm 1,1$ mm; DV, -1,3 mm (odległość od bregmy). Wiertłem dentystycznym wywiercono otwory w czaszce i wykonano infuzję 0,5 μ l zawiesiny nośników wirusowych LV lub AAV1/2 do każdego z hipokampów za pomocą 10 μ l strzykawki z metalową, ukośnie ściętą igłą o średnicy 26G (SGE Analytical Science, #SGE010RNS). Strzykawka do iniekcji połączona była z pompą infuzyjną (UMP3, WPI, Sarasota, USA) i kontrolerem (Micro4, WPI, Sarasota, USA), a infuzji dokonano z prędkością 0,1 μ l/min. Po zakończonej

infuzji, igłę pozostawiono na miejscu przez kolejne 5 minut, a następnie podniesiono +0,1 mm DV i pozostawiono na kolejne 5 minut, aby uniknąć wycieku mieszaniny.

W zależności od eksperymentu zwierzętom podawano wektory lentiwirusowe (LV) lub adenowirusowe (AAV). Wektor LV: H1-shRNA_PSD95-Ub-GFP (miano: $2,52 \times 10^8/\mu\text{l}$) koduje krótką sekwencję RNA o strukturze szpilki do włosów (shRNA) komplementarną do sekwencji mRNA białka PSD-95 i wyciszającą jego ekspresję, natomiast wektor kontrolny (H1-shRNA_lucyferaza; miano: $6,52 \times 10^8/\mu\text{l}$) skonstruowany został na podstawie wektora pSUPER z shRNA komplementarnym do mRNA lucyferazy *Renilla* (5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3') i wklonowany do wektora pTRIP. W doświadczeniach wykorzystano także wektory AAV kodujące gen PSD-95 pod promotorem αCaMKII . Myszom podano wektory wirusowe kodujące białko PSD-95 w formie natywnej (αCaMKII -PSD95_WT-mCherry; miano: $1,35 \times 10^9/\mu\text{l}$) oraz zmutowanej z punktową substytucją seryny (S) 73 na alaninę (A) (αCaMKII -PSD95_S73A-mCherry; miano: $9,12 \times 10^9/\mu\text{l}$). Grupie kontrolnej podano wirus αCaMKII -mCherry (miano: $7,5 \times 10^7/\mu\text{l}$). Konstrukty H1-shRNA_PSD95-Ub-GFP otrzymano od Prof. Olivera M. Schlüter'a (European Neuroscience Institute Göttingen, Niemcy), a konstrukty αCaMKII -mCherry otrzymano z laboratorium Prof. Karla Deisseroth'a (Stanford University, USA). Wirusy przygotowano w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN. Po infuzji, igłę usunięto z mózgu, a skórę zszyto rozpuszczalnymi nićmi chirurgicznymi, PGA USP 4-0 (Atramat, #R2094-75), i znieczulono miejscowo żelem z lidokainą (20 mg/g, Lignocainum Jelfa). Po operacji zwierzęta przebywały przez 7 dni w pojedynczych klatkach domowych w celu zagojenia rany pooperacyjnej, a ich stan był regularnie monitorowany.

W celu oceny transdukcji komórek wirusami LV lub AAV, sfotografowano grzbietowe części hipokampa na utrwalonych preparatach mysich skrawków mózgow (wg wyżej opisanego protokołu) na mikroskopie konfokalnym Leica TCS SP8, powiększenie 63x. Analizę wydajności transdukcji komórek, które produkowały egzogenne białka wykonano w warstwie komórek piramidalnych (łac. *stratum pyramidale*, StPyr) pola CA1 hipokampa, z wizualizacją komórek nerwowych przez NeuN (białko jądrowe specyficzne dla dojrzałych neuronów; marker neuronów). W tym celu przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne według protokołu opisanego w punkcie 3.4 niniejszego rozdziału z wykorzystaniem następujących przeciwciał: pierwszorzędowe przeciwciało rozpoznające antygeny białka NeuN

(1:500, Abcam, #ab177487; RRID: AB_2532109) i przeciwciało drugorzędowe Alexa Fluor 647 (1:500, Invitrogen, #A31573; RRID: AB_2536183) do analizy skrawków z lentiwirusem kodującym białko GFP lub drugorzędowe przeciwciało Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, #A21206; RRID: AB_2535792) do skrawków z wirusami AAV kodującymi białko mCherry. Komórkę uważano za stransfekowaną jeśli obserwowano fluorescencję specyficzną dla egzogenego białka w bliskim otoczeniu neuronu. Następnie, uzyskany wynik podzielono przez liczbę wszystkich widocznych w polu widzenia komórek w obrazowanej warstwie piramidalnej.

3.6. Obrazowanie i analiza zdjęć mikroskopowych

Do obrazowania preparatów użyto mikroskopu konfokalnego Zeiss Spinning Disc z obiektywem o powiększeniu 63x z immersją olejową (Zeiss, Göttingen, Niemcy). Serię zdjęć dendrytów wypełnionych GFP wykonano w środkowej części warstwy promienistej (łac. *stratum radiatum*, StRad) pola CA1 hipokampa z powiększeniem cyfrowym 1,6x, w interwałach 0,26 μm w osi z. W efekcie uzyskano zdjęcia o rozdzielczości 512 x 512 px i wymiarach 67,72 x 67,72 μm . Skrawki mózgu fotografowano obustronnie, a na każde zwierzę wykonano od 6 do 8 mikrofotografii (jeden dendryt z jednego neuronu na zdjęciu). Dla wszystkich zdjęć z danego barwienia/doświadczenia używano jednakowych ustawień mikroskopu.

Do analizy kolców dendrytycznych wykorzystano w pół-automatyczny program SpineMagick! (Ruszczycki i in., 2014). Gęstość oraz średnią powierzchnię punktu PSD-95(+), jak również ich kolokalizację z kolcami dendrytycznymi analizowano z użyciem makro programu ImageJ (Fiji) napisanego przez dr Kacpra Łukasiewicza w języku JAVA (**Makro do analizy kolokalizacji kolców dendrytycznych i PSD-95** w Suplemencie) (Fedulov i in., 2007).

W doświadczeniach z wykorzystaniem konstruktów wirusowych (Rycina 12, 13) zdjęcia wykonano na mikroskopie konfokalnym Leica TCS SP8 (Leica Microsystem, Wetzlar, Niemcy) z obiektywem o powiększeniu 63x, z immersją olejową i powiększeniem cyfrowym 1,6x, zaopatrzonego w detektor PMT. Za wskaźnik zmian w poziomie białka PSD-95, przyjęto „średnią wartość w skali szarości” (MGV) analizowanych obrazów. Wskaźnik ten przyjmował wartość od 0 do 255 (**Makro do analizy poziomu białka** w Suplemencie).

W celu analizy objętości hipokampów myszy, sfotografowano co szósty skrawek mózgu utrwalony według procedury opisanej powyżej. Zdjęcia wykonano na mikroskopie Leica AF7000 (Leica Microsystem, Wetzlar, Niemcy) w jasnym polu widzenia, z obiektywem o powiększeniu 5x, a dopasowane i nałożone zdjęcia przeanalizowano w programie Reconstruct (Fiala, 2005) dostępnym na <http://synapses.clm.utexas.edu/tools/reconstruct/reconstruct.stm>.

3.7. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana w programie GraphPad Prism 8. Dokładne dane dotyczące wielkości grup (liczba myszy, dendrytów lub kolców dendrytycznych) przedstawiono na wykresach lub w podpisach do rycin. Do analizy danych o rozkładzie normalnym i równych wariancjach wykorzystano test t-Studenta, jedno-, dwu- lub trzyczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i analizę modeli mieszanych (ang. *mixed-effects model*) z powtórzonymi pomiarami, a hipotezy testowane *a priori* badano testem Sidaka lub Dunna dla powtórzonych pomiarów. Do analizy zaplanowanych porównań użyto testu LSD Fishera, a do analizy porównań wielokrotnych stosowano test Tukeya. W przypadku danych o rozkładzie nieparametrycznym zastosowano test sumy rang (kolejności par) Wilcozona.

Powierzchnie kolców dendrytycznych oraz punkty PSD-95 nie prezentują rozkładu normalnego i zostały przeanalizowane testem Kruskala-Wallisa. Rozkład częstości (ang. frequency distribution) powierzchni kolca dendrytycznego do powierzchni punktu PSD-95 porównywano testem Kolmogorova-Smirnova. Korelacje analizowano z użyciem testu korelacji rang Spearmana, a różnice nachylenia i przesunięcia linii regresji analizowano testem ANCOVA. Dane o rozkładzie normalnym zostały przedstawione na wykresach jako średnia $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM). Dla pomiarów nie charakteryzujących się rozkładem normalnym przedstawiono mediany i zakres międzykwartyłowy (IQR). Różnice pomiędzy grupami uznano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Trening wyboru przestrzennego u młodych i starych myszy

Aby odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób starzenie się wpływa na podejmowane strategie behawioralne w czasie dokonywania wyboru przestrzennego, wykorzystałam system IntelliCage, który zapewnia warunki zbliżone do tych występujących w środowisku naturalnym. Klatki IntelliCage pozwalają na badanie zarówno procesu wyboru przestrzennego (Kiryk i in., 2011; Śliwińska i in., 2020), jak i nieprzestrzennych aspektów zachowania, których celem jest zdobycie nagrody (Radwanska i Kaczmarek, 2012), czy interakcje społeczne (Harda i in., 2018; Kiryk i in., 2011).

Młode, dojrzałe samice myszy Thy1-GFP(M) (5 ± 1 miesięcy, $n=6$) i zwierzęta w podeszłym wieku (18 ± 2 miesięcy, $n=6$) poddano treningowi w klatkach IntelliCage. Zwierzęta młode i stare trzymano w dwóch oddzielnych klatkach. Podczas adaptacji, myszy miały swobodny dostęp do dwóch aktywnych rogów klatki z wodą. W trakcie treningu, woda w mniej preferowanym rogu w ostatnim dniu adaptacji, została zastąpiona roztworem sacharozy (5% w wodzie kranowej) (**Rycina 7A**) (Harda i in., 2018; Śliwińska i in., 2020). W celu dokonania ogólnej charakterystyki zachowania zwierząt, zmierzono aktywność myszy (liczba wizyt do rogów) i spożycie płynów (liczba liżnięć) w czasie adaptacji i treningu. Nie zaobserwowano różnic w aktywności młodych i starych myszy (**Rycina 7B.i**) (dwuczynnikowa RM ANOVA, efekt wieku: $F_{1, 10} = 1,421$, $P = 0,261$), ale odnotowano istotny efekt treningu ($F_{7, 70} = 22,29$, $P < 0,001$). Dostęp do słodkiego roztworu sacharozy spowodował znaczny wzrost częstości wizyt w porównaniu do ostatniego dnia adaptacji u wszystkich zwierząt niezależnie od wieku (**Rycina 7C.i**) (dwuczynnikowa RM ANOVA, trening: $F_{1, 10} = 33,10$, $P < 0,001$; wiek: $F_{1, 10} = 0,094$, $P = 0,766$; test *post hoc* Sidaka dla powtórzonych pomiarów: młode vs. stare, $P < 0,05$). Zaobserwowano także wzmożone spożycie płynów przez młode osobniki w trakcie trwania całego doświadczenia – zarówno w fazie adaptacji, jak i w treningu (**Rycina 7B.ii**) (efekt treningu: $F_{7, 70} = 9,56$, $P < 0,001$; efekt wieku: $F_{1, 10} = 21,96$, $P < 0,001$; test *post hoc* Sidaka dla powtórzonych pomiarów: (dzień 1.)_młode vs. stare $P = 0,007$, (dzień 8.)_młode vs. stare $P < 0,001$). Porównując zmiany spożycia płynów między ostatnim dniem adaptacji a treningiem, jedynie u młodych zwierząt odnotowano istotny

wzrost (**Rycina 7C.ii**) (trening: $F_{1,10} = 28,12$, $P < 0,001$; wiek: $F_{1,10} = 4,054$, $P = 0,072$; test *post hoc* Sidaka dla powtórzonych pomiarów: młode $P < 0,001$; stare $P = 0,128$). Obserwacje te pokazują, że młode i starzejące się zwierzęta nie różniły się istotnie aktywnością podstawową oraz tą indukowaną treningiem, a jedynie ilością spożywanych płynów w czasie treningu, co dowodzi braku poważnych zaburzeń motorycznych u starych myszy.

Miarą poprawnie dokonanych wyborów przestrzennych w czasie treningu, była zmiana preferencji rogu z nagrodą w czasie treningu (Δ % wizyt), podczas gdy nieprzestrzenny aspekt pamięci nagrody mierzono jako zmianę preferencji picia z rogu (Δ % liźnięć). Zarówno młode, jak i stare zwierzęta zwiększyły częstotliwość wizyt w rogu z nagrodą (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 34,68$, $df = 1$, $P < 0,001$; efekt treningu: $F_{2,161; 19,93} = 23,85$, $P < 0,001$), co dowodzi rozwijającej się preferencji przestrzennej (**Rycina 7D.i**). Zwierzęta stare wykazywały jednak większą zmianę preferencji rogu niż osobniki młode (efekt wieku: $F_{1,10} = 14,42$, $P = 0,004$; interakcja wiek $\times$ czas: $F_{9,83} = 3,444$, $P = 0,001$), co potwierdzono testem *post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań ($P < 0,05$). Ponadto, u wszystkich myszy niezależnie od wieku zaobserwowano zwiększoną częstotliwość liźnięć sacharozy (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 70,01$, $df = 1$, $P < 0,001$; efekt treningu: $F_{1,376; 12,08} = 128,4$, $P < 0,001$), co dowodzi formowaniu pamięci i preferencji nagrody. Jednak tu także zaobserwowano wpływ wieku ($F_{1,10} = 21,11$, $P < 0,001$) jak i interakcje wieku z czasem ($F_{5,49} = 5,418$, $P < 0,001$) (**Fig. 7D.ii**).

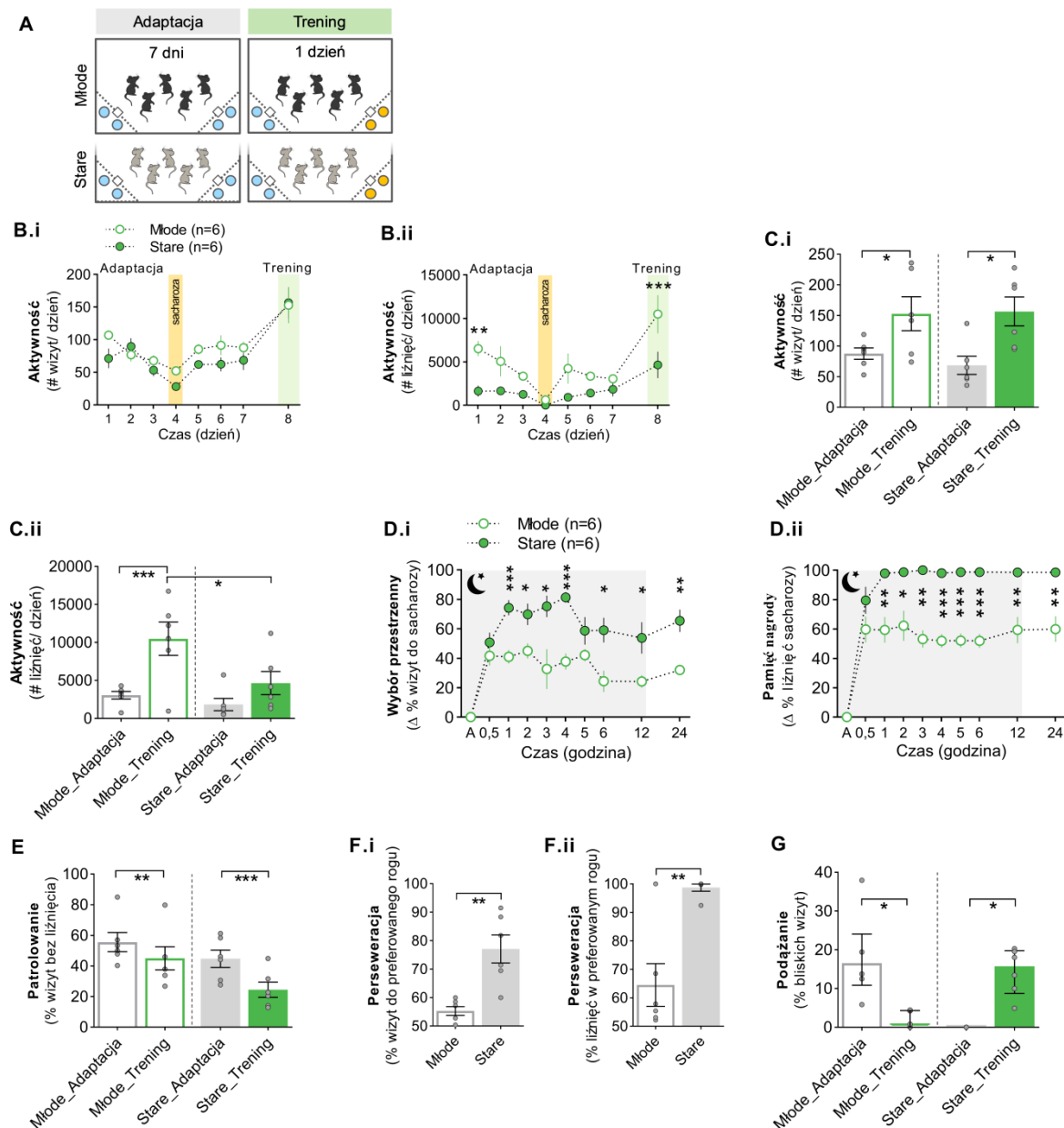
Przedstawione dane pokazują, że zarówno młode, jak i stare myszy zazwyczaj dokonywały poprawnych wyborów przestrzennych, formując przy tym pamięć nagrody. Zaskakująco, zmiana preferencji rogu i spożycia sacharozy była znacznie większa w grupie starzejących się zwierząt. Co istotne, częstotliwość wizyt w narożnikach klatki IntelliCage wynika nie tylko z dokonywanych wyborów wymagających informacji przestrzennej, ale również z naturalnego patrolowania rogów (wizyty bez picia płynów), zwyczajowych wizyt w preferowanych miejscach (perseweracji), czy interakcji społecznych (Harda i in., 2018; Kiryk i in., 2011; Śliwińska i in., 2020). W związku z powyższym sprawdziłam, czy myszy stare i młode różniły się pod względem częstości takich zachowań, co mogłoby mieć wpływ na kształtowanie preferencji miejsca w czasie treningu.

Zaobserwowano istotne zmniejszenie się częstotliwości wizyt patrolujących (wizyt bez liźnięcia) w czasie treningu (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{1, 10} = 56,54$, $P < 0,001$), niezależnie od wieku ($F_{1, 10} = 3,420$, $P = 0,094$) (**Rycina 7E**). Test *post hoc* Sidaka potwierdził brak różnic w częstotliwości wizyt patrolujących podczas adaptacji i treningu pomiędzy młodymi i starymi myszami (dla obu $P > 0,05$). Obniżona częstotliwość wizyt tego typu w czasie treningu dowodzi, iż zarówno młode, jak i stare osobniki ograniczają zwyczajową eksplorację klatki i nie jest to przyczyną różnic w preferencji rogów z nagrodą obserwowanych pomiędzy tymi grupami wiekowymi.

Przetestowano również persewerację, którą mierzono jako częstotliwość wizyt i liźnięć do preferowanego narożnika. W czasie adaptacji, stare myszy były bardziej perseweracyjne, zarówno pod względem wykonywanych wizyt (test t-Studenta, $t = 4,194$, $df = 10$, $P = 0,002$) (**Rycina 7F.i**), jak i liźnięć ($t = 4,500$, $df = 10$, $P = 0,001$) w porównaniu do myszy młodych (**Rycina 7F.ii**). Wskazuje to, że obserwowane wzmożone zachowania perseweracyjne starych myszy w czasie fazy adaptacji przyczyniły się do większej zmiany preferencji rogu z nagrodą podczas treningu.

Ostatnią testowaną miarą zachowania myszy była częstotliwość wizyt społecznych [wizyta bliska (interwał < 1 sek.) po wizycie innej myszy] w grupie młodych i starych zwierząt (**Rycina 7G**) (Harda i in., 2018). Test sumy rang (kolejności par) Wilcozona wykazał, że młode zwierzęta w trakcie treningu wykonywały mniej wizyt społecznych niż w czasie adaptacji ($P = 0,031$), podczas gdy u starych myszy obserwowano ich wzrost ($P = 0,031$), co sugeruje że starsze zwierzęta częściej obserwują inne myszy i podążają za nimi w trakcie treningu.

Przeprowadzone doświadczenie dowodzi, iż zarówno młode jak i starzejące się myszy są w stanie dokonać trafnych wyborów przestrzennych oraz formują pamięć nagrody. Osobniki stare prezentowały większą zmianę preferencji rogu podczas treningu jako efekt strategii behawioralnej charakteryzującej się zwiększoną skłonnością do zachowań perseweracyjnych i społecznych.



Rycina 7. Stare myszy rozwijają silną preferencję do rogu z nagrodą w wyniku zwiększonej częstotliwości wizyt perseweracyjnych i społecznych.

(A) Schemat doświadczenia. W fazie adaptacji, myszy miały dostęp do dwóch aktywnych rogów klatki IntelliCage. Podczas treningu preferencji miejsca, sacharozę podawano do rogu rzadziej odwiedzanego przez myszy (mniej preferowanego) w czasie adaptacji. W trakcie trwania całego eksperymentu populacje osobników młodych i starych utrzymywano oddzielnie. (B) Aktywność myszy w trakcie adaptacji i treningu. Całkowita dobową liczbą wizyt (i) i liżnięć (ii) do/z obu dostępnych rogów. (C) Dobowa aktywność myszy w ostatnim dniu adaptacji i podczas treningu prezentowana w aspekcie wykonanych (i) wizyt i (ii) liżnięć. (D) Rozwój preferencji do rogu z nagrodą w trakcie treningu. Zmiana preferencji wykonanych wizyt (i) i liżnięć (ii) do/z rogu z sacharozą w porównaniu do pomiarów w ostatniej dobie adaptacji. Fazę ciemną cyklu dobowego oznaczono szarym polem. (E) Procentowy udział wizyt patrolujących (bez liżnięcia), (F) wizyt (i) i liżnięć (ii) perseweracyjnych w trakcie adaptacji i treningu oraz (G) wizyt społecznych (podążanie do

rogu za innymi osobnikami w odstępie krótszym niż 1 sekunda). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ dla testów *post hoc*. Na wykresach (B-F) przedstawiono średnią $\pm$ SEM, (G) mediana $\pm$ IQR. „A” na wykresach (D.i,ii) przedstawia preferencję do rogu w ostatnim dniu adaptacji (do tego samego rogu w którym na czas treningu umieszczono roztwór sacharozy i dla którego prezentowane są dane w kolejnych godzinach treningu).

4.2. Wpływ interakcji społecznych na dokonywanie wyborów przestrzennych u starych myszy

Aby zweryfikować rolę interakcji społecznych w dokonywaniu wyborów przestrzennych u starych osobników, przetestowano czy obecność młodych myszy w tej samej klatce może wpływać na podejmowane decyzje przestrzenne i pamięć nagrody. W tym celu, przetestowano nową kohortę młodych ($n=9$) i starych myszy ($n=13$), które zostały wymieszane i trenowane wspólnie zgodnie z protokołem przedstawionym na **Rycinie 8A**. Zaobserwowano istotny wpływ wieku (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{1, 160} = 81,01$, $P < 0,001$) i treningu ($F_{7, 160} = 13,72$, $P < 0,001$) na aktywność zwierząt w trakcie adaptacji i treningu (**Rycina 8B.i**). Istotność tych różnic potwierdził test *post hoc* Sidaka dla powtórzonych pomiarów, który dowiódł, że w trakcie swobodnego dostępu do wody w czasie adaptacji, stare myszy były mniej aktywne i eksplorowały środowisko znacznie rzadziej niż osobniki młode ($P < 0,05$). Podczas treningu, aktywność młodych i starych myszy wzrosła do podobnego poziomu ($P = 0,281$).

Kiedy przyjrzymy się dokładniej zmianom aktywności zwierząt mierzonych liczbą wykonanych wizyt w ostatnim dniu adaptacji i w treningu, zaobserwujemy istotny wpływ treningu (dwuczynnikowa RM ANOVA, efekt treningu: $F_{1, 19} = 22,17$, $P < 0,001$), ale nie wieku ($F_{1, 19} = 3,643$, $P = 0,072$) (**Rycina 8C.i**). Jak wykazał test *post hoc* Sidaka, zarówno młode, jak i stare myszy zwiększyły aktywność podczas treningu ($P = 0,042$ i $P < 0,001$). Odnotowano także istotny efekt treningu na spożycie płynów (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{1,552; 31,05} = 49,84$, $P < 0,001$), ale nie zaobserwowano różnic związanych z wiekiem ($F_{1, 20} = 1,377$, $P = 0,254$) (**Rycina 8B.ii**). Analiza *post hoc* Sidaka potwierdziła brak istotnych różnic w konsumpcji płynów pomiędzy młodymi i starymi zwierzętami, choć obie grupy zwiększyły spożycie w dniu treningu ($P < 0,001$ dla obu) (dwuczynnikowa RM ANOVA, efekt treningu: $F_{1, 20} = 40,01$, $P < 0,001$, efekt wieku: $F_{1, 20} = 0,496$, $P = 0,489$) (**Rycina 8C.ii**). Oznacza to, że wymieszanie w populacji młodych i starych myszy nie wpłynęło na ich częstość

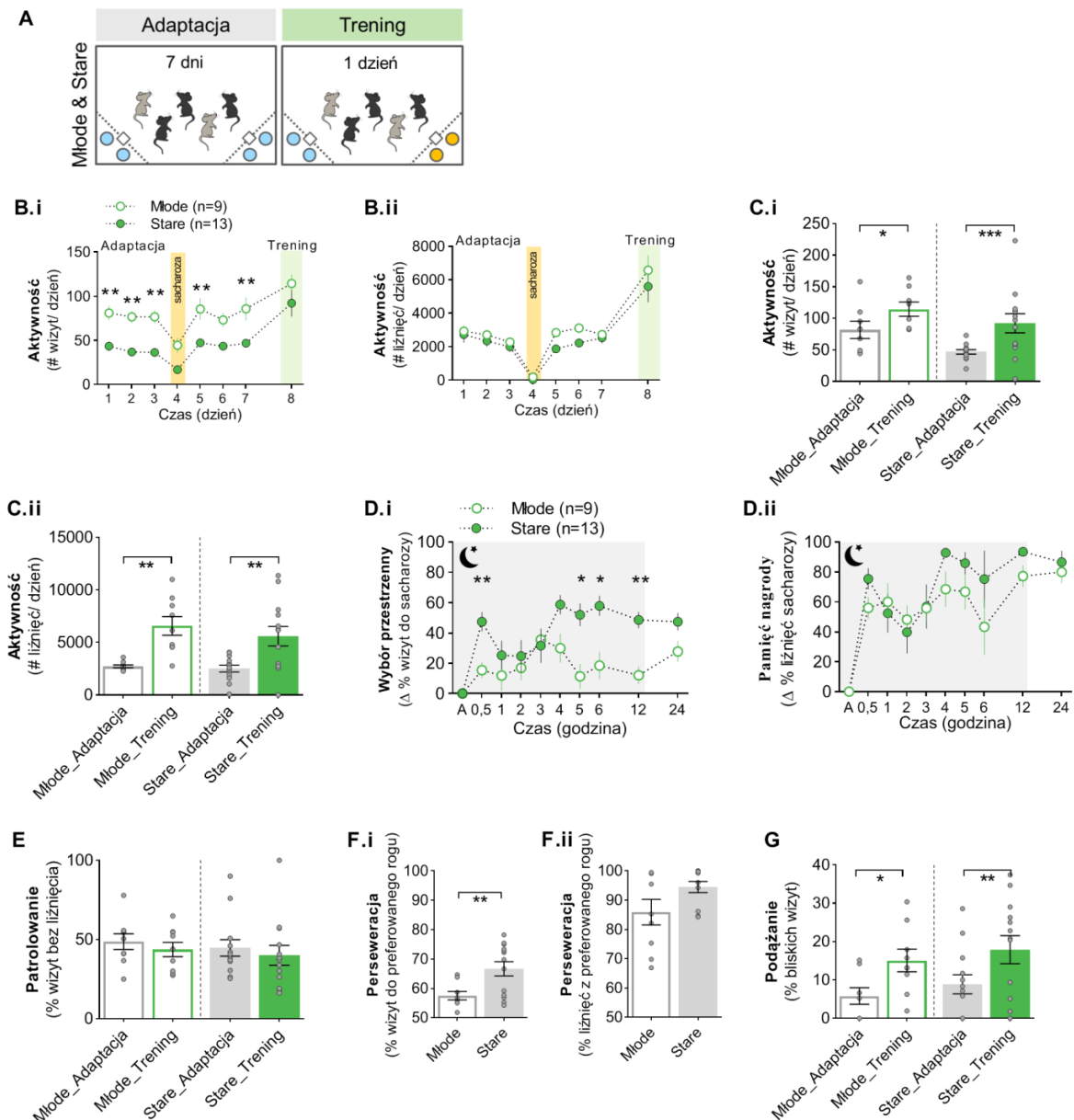
wizyt w rogach podczas treningu, ale nieznacznie zwiększyło konsumpcję nagrody przez stare osobniki.

Analiza preferencji rogu z nagrodą w trakcie treningu pokazała istotny wpływ czasu na zmianę preferencji wizyt (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 15,07$, $df = 1$, $P < 0,001$; efekt treningu: $F_{4,394; 81,53} = 7,194$, $P < 0,001$), co dowodzi kształtowania preferencji przestrzennej (**Rycina 8D.i**). Ponadto, zaobserwowano również istotny wpływ wieku zwierząt ($F_{1, 20} = 15,53$, $P < 0,001$) oraz interakcję pomiędzy wiekiem i czasem ($F_{9, 167} = 2,99$, $P = 0,002$). Test *post hoc* Sidaka dla powtórzonych pomiarów pokazał natomiast, że różnica pomiędzy młodymi i starymi zwierzętami obserwowana była na początku trwania treningu (0,5 godz., $P = 0,009$) oraz po kilku godzinach od jego rozpoczęcia (5 godz., $P = 0,014$; 6 godz., $P = 0,034$; 12 godz., $P = 0,002$), lecz nie między godz. 1 a 3. Co więcej, analiza liczby liźnięć sacharozy pokazała istotny efekt treningu (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 14,05$, $df = 1$, $P < 0,001$; $F_{2,99; 51,49} = 19,48$, $P < 0,001$), co dowodzi formowaniu się pamięci nagrody (**Rycina 8D.ii**). Nie zaobserwowano jednak różnic w spożyciu sacharozy pomiędzy młodymi i starzejącymi się myszami ($F_{1, 20} = 2,502$, $P = 0,129$) oraz interakcji pomiędzy wiekiem i czasem ($F_{9, 155} = 1,149$, $P = 0,332$), co dowodzi, że w mieszanej populacji zmiana preferencji nagrody stała się podobna u myszy starych i młodych.

Następnie zweryfikowano, czy pod wpływem wymieszania młodych i starszych osobników, ulegnie zmianie częstotliwość wizyt patrolujących, perseweracyjnych lub społecznych, w porównaniu do populacji trenowanych osobno. Nie zaobserwowano wpływu wieku (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{1, 20} = 0,269$, $P = 0,610$), ani treningu ($F_{1, 20} = 1,943$, $P = 0,179$) na częstotliwość wizyt patrolujących (**Rycina 8E**). Tak więc, w przeciwieństwie do populacji niemieszanej, częstotliwość tego rodzaju wizyt wynikających z naturalnej potrzeby eksploracji, pozostała wysoka również w trakcie treningu. Ponadto, odnotowano istotny statystycznie efekt wieku na częstotliwość wizyt perseweracyjnych, ale nieistotny dla liźnięć perseweracyjnych (**Rycina 8F.i,ii**). Co ciekawe, częstotliwość wizyt perseweracyjnych wykonywanych przez myszy stare w populacji mieszanej, w czasie adaptacji była niższa niż w populacji trenowanej indywidualnie (66% vs. 80%) (test t-Studenta, $t = 2,891$, $df = 20$, $P = 0,009$). Natomiast, młode myszy w populacji mieszanej wykonały więcej liźnięć perseweracyjnych w porównaniu do zwierząt trenowanych osobno (85% vs. 65%) ($t = 2,013$, $df = 20$, $P = 0,058$). Analizując częstotliwość wizyt społecznych,

zaobserwowano istotny wpływ treningu (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 4,645$, $df = 1$, $P = 0,031$, $F_{1, 19} = 15,68$, $P < 0,001$), ale brak różnic wywołanych wiekiem ($F_{1, 20} = 0,195$, $P = 0,663$) oraz interakcji pomiędzy tymi dwoma czynnikami ($F_{1, 20} = 0,641$, $P = 0,433$) (**Rycina 8G**). Jak potwierdzono testem *post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań, nie znaleziono istotnych różnic w częstości wizyt społecznych pomiędzy młodymi i starymi osobnikami w trakcie adaptacji lub treningu. Zarówno młode ($P = 0,018$), jak i stare zwierzęta ($P = 0,006$) zwiększyły częstotliwość tego typu wizyt w dniu treningu w porównaniu do fazy adaptacji.

Podsumowując, doświadczenie przeprowadzone na mieszanej populacji myszy młodych i starych pokazało, że wysoka skłonność do wizyt perseweracyjnych i interakcji socjalnych może przyczyniać się do silnej preferencji miejsca i nagrody u starych myszy. Na częstotliwość takich zachowań wpływają osobniki przebywające w klatce, a zatem w towarzystwie myszy młodych częstość zachowań perseweracyjnych myszy starych spada.



Rycina 8. Na wybory przestrzenne starych myszy wpływają interakcje społeczne.

(A) Schemat doświadczenia. W fazie adaptacji, myszy miały dostęp do dwóch aktywnych rogów klatki IntelliCage. Podczas treningu preferencji miejsca, sacharozę podawano do rogu mniej preferowanego w czasie adaptacji. W trakcie trwania eksperymentu myszy młode i stare utrzymywano w populacji mieszanej. (B) Aktywność myszy w trakcie adaptacji i treningu. Całkowita dobowo liczba wizyt (i) i liżnięć (ii) do/z obu dostępnych rogów dla osobników młodych i starych żyjących razem w jednej klatce. (C) Dobowa aktywność myszy w ostatnim dniu adaptacji i podczas treningu ilustrująca wzrost preferencji do rogu z nagrodą w czasie treningu. Wykresy przedstawiają ilość wizyt (i) i liżnięć (ii) do/z rogu z sacharozą. (D) Wzrost preferencji do rogu z nagrodą w trakcie treningu. Zmiana preferencji wykonywanych wizyt (i) i liżnięć (ii) do/z rogu z sacharozą w porównaniu do pomiarów w ostatniej dobie adaptacji. Fazę ciemną cyklu dobowego oznaczono szarym polem. (E) Procentowy udział wizyt patrolujących (bez liżnięcia), (F) wizyt (i) i liżnięć (ii) persewercyjnych w trakcie adaptacji i treningu oraz (G) wizyt społecznych (podążanie do rogu za innymi osobnikami w odstępnie krótszym niż 1 sekunda). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$,

*** $P < 0,001$ dla testów *post hoc*. Na wykresach przedstawiono średnią $\pm$ SEM. „A” na wykresach (D.i,ii) przedstawia preferencję do rogu w ostatnim dniu adaptacji (do tego samego rogu w którym na czas treningu umieszczono roztwór sacharozy i dla którego prezentowane są dane w kolejnych godzinach treningu).

4.3. Trening wyborów przestrzennych i wiek wpływają na plastyczność kolców dendrytycznych

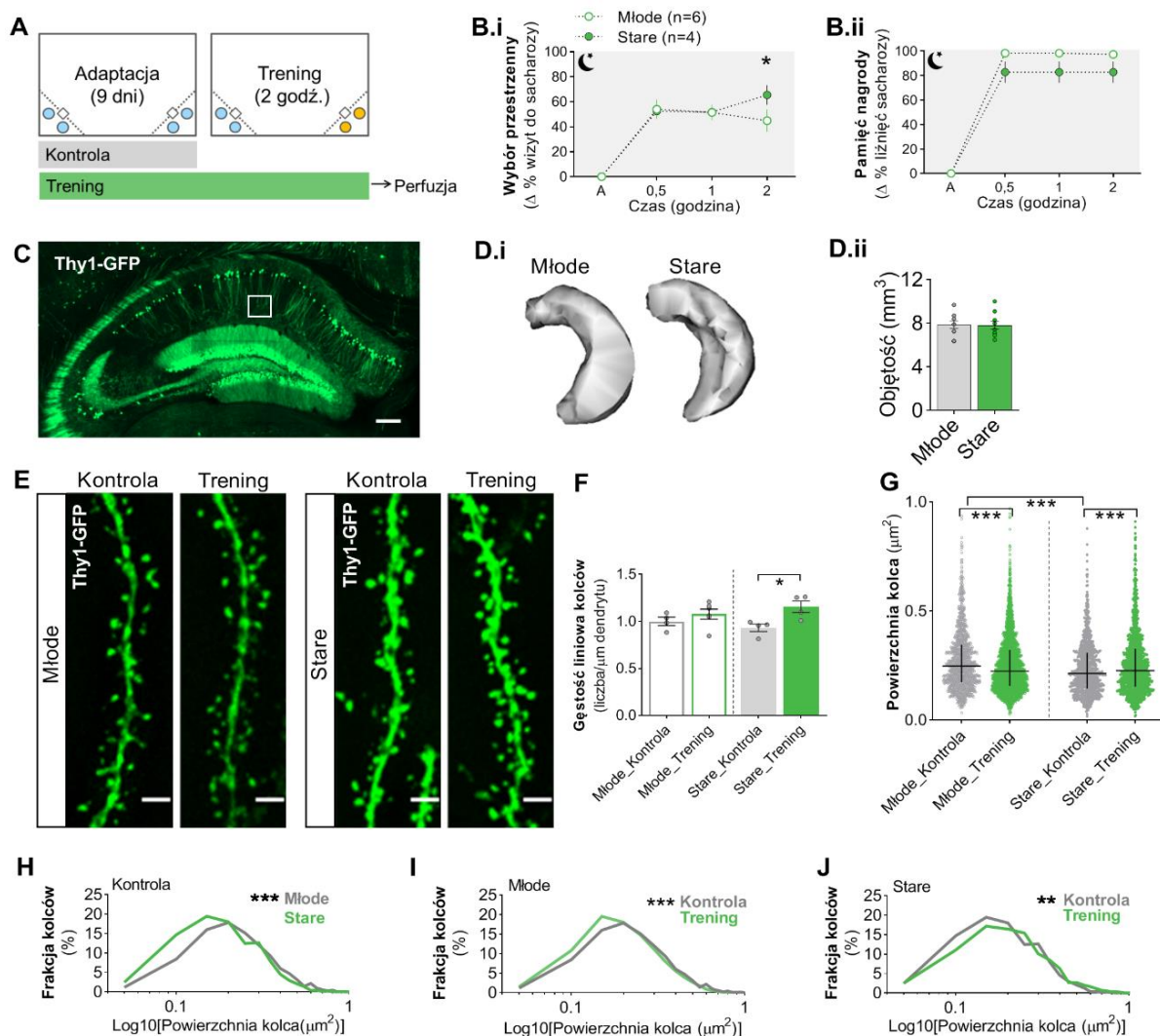
Powstawanie pamięci u starzejących się myszy związane jest z nowymi formami plastyczności synaptycznej (Aziz i in., 2019; Lee i in., 2005). W swoich badaniach, jako wskaźnik plastyczności synaptycznej zachodzącej w czasie treningu (Graziane i in., 2016), przyjąłam zmiany morfologii i gęstości kolców dendrytycznych u młodych i starych zwierząt. Dwie godziny od rozpoczęcia treningu apetytywnego, czyli od momentu umieszczenia roztworu sacharozy w jednym z rogów i napicia się go przez zwierzę, myszy uśpiono i sperfundowano w celu pobrania tkanki. Wybrano dwugodzinny punkt czasowy na analizę kolców dendrytycznych, ze względu na fakt, że wcześniejsze doświadczenia wykazały istotne, lecz przejściowe zmiany morfologii kolców w tym punkcie czasowym po treningu zależnym od hipokampa (Radwanska i in., 2011). W doświadczeniu wykorzystano młode (5 miesięcy) i stare (18 miesięcy) myszy linii Thy1-GFP(M) (Feng i in., 2000), które charakteryzują się ekspresją białka zielonej fluorescencji (GFP) w około 10% neuronów glutaminianergicznym pola CA1 (**Rycina 9C**). Zwierzęta młode i stare trenowano w osobnych klatkach, a samice z grupy kontrolnej uśmiercono tuż po zakończeniu adaptacji (**Rycina 9A**). Analizując zachowanie zwierząt zaobserwowano istotny efekt treningu (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 0,8299$, $df = 1$, $P = 0,362$; trening: $F_{3, 25} = 52,93$, $P < 0,001$) na zmianę częstotliwości wizyt do rogu z sacharozą, co dowodzi wykształceniu preferencji do rogu z nagrodą zarówno przez młode i stare zwierzęta (**Rycina 9B.i**). Nie zaobserwowano różnic związanych z wiekiem myszy ($F_{1, 9} = 0,9315$, $P = 0,36$) lub interakcji pomiędzy wiekiem i czasem ($F_{3, 25} = 1,601$, $P = 0,214$) na preferencję do rogu z nagrodą. Analiza *post hoc* testem LSD dla planowanych porównań wykazała jednak, że starzejące się samice prezentowały większą zmianę preferencji rogu z nagrodą niż osobniki młode pod koniec trwania treningu (2 godz.) ($P < 0,05$). Pod wpływem treningu zmieniła się preferencja rogu z którego zwierzęta piły, na korzyść narożnika z nagrodą i zmiana ta była niezależna od wieku (analiza modeli

mieszanych, $\chi^2 = 18,78$, $df = 1$, $P < 0,001$; trening: $F_{3, 26} = 512$, $P < 0,001$; wiek: $F_{1,9} = 3,828$, $P = 0,082$) (**Rycina 9B.ii**).

Aby przyjrzeć się dokładniej zachodzącym zmianom związanym ze starzeniem się, początkowo zwierzyłam całkowitą objętość hipokampów młodych i starych osobników. Stereologiczna analiza skrawków mózgów wybarwionych DAPI, wykazała brak różnic w wielkości hipokampów między myszami starymi i młodymi, co dowodzi braku poważnych zmian neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem (**Rycina 9D.i, ii**) (test t-Studenta, $t = 0,098$, $df = 17$, $P = 0,923$).

Morfologię kolców dendrytycznych analizowano w warstwie promienistej (*stratum radiatum*, StRad) pola dCA1 (**Rycina 9C, E**), ponieważ właśnie ten region mózgu zaangażowany jest w procesy poznawcze obejmujące podejmowanie wyborów przestrzennych (Bannerman i in., 2012, 2014). Na zmiany gęstości kolców dendrytycznych, istotny wpływ miał trening (dwuczynnikowa ANOVA, $F_{1, 14} = 8,126$, $P = 0,013$), ale nie wiek ($F_{1, 14} = 0,0103$, $P = 0,921$), czy interakcja pomiędzy tymi czynnikami ($F_{1, 14} = 1,901$, $P = 0,19$) (**Rycina 9F**). Test *post hoc* Tukeya dla porównań wielokrotnych pokazał brak różnic gęstości kolców dendrytycznych między grupami eksperymentalnymi. Przyglądając się gęstości kolców po dwóch godzinach treningu zaobserwowano trend wzrostowy u osobników starych, jednak wynik testu był nieistotny statystycznie ($P = 0,054$). Analiza powierzchni kolców dendrytycznych wykazała istotną różnicę pomiędzy grupami doświadczalnymi (test Kruskala-Wallisa, $H = 42,21$, $P < 0,001$) (**Rycina 9G**). Test *post hoc* Dunna dla porównań wielokrotnych potwierdził, że u młodych myszy z grupy kontrolnej odnotowano większe kolce niż w grupie kontrolnej starzejących się zwierząt (mediana $0,248$ vs. $0,214 \mu m^2$) ($P < 0,001$). Co więcej, zaobserwowano przesunięcie się mediany powierzchni kolców u młodych myszy po treningu w kierunku mniejszych wartości ($0,248$ vs. $0,225 \mu m^2$) ($P < 0,001$), w przeciwieństwie do wyższych pomiarów u starych zwierząt ($0,214$ vs. $0,227 \mu m^2$) ($P < 0,001$). Obserwacje te potwierdzono analizą rozkładu częstotliwości powierzchni kolców przedstawionych na **Rycinach 9H-J**. Odnotowano częstsze występowanie małych kolców dendrytycznych u starych zwierząt w porównaniu do młodych osobników z grupy kontrolnej (test Kolmogorova-Smirnova, $D = 0,1216$, $P < 0,001$) (**Rycina 9H**) oraz u młodych myszy po treningu w porównaniu do kontroli ($D = 0,074$, $P < 0,001$) (**Rycina 9I**), podczas gdy częstotliwość występowania małych kolców u starych zwierząt spadła po treningu ($D = 0,079$, $P = 0,003$) (**Rycina 9J**).

Podsumowując, przedstawione dane dowodzą, że trening przestrzenny w klatce IntelliCage prowadzi do kurczenia się kolców dendrytycznych w dCA1 u młodych myszy. W przeciwieństwie do młodych zwierząt, u osobników starych, obserwowano tworzenie się nowych kolców i wzrost średniej wielkości kolców dendrytycznych, co może sugerować alternatywną formę plastyczności synaptycznej. Aby zweryfikować tę hipotezę, w następnym etapie przeanalizowałam ekspresję białka postsynaptycznego, PSD-95, które kontroluje lokalizację receptorów AMPA (AMPA) w synapsie i wpływa na plastyczność synaps glutaminianergiczných (Bats i in., 2007; Opazo i in., 2012).



Rycina 9. Trening powoduje kurczenie się kolców dendrytycznych w regionie CA1 u młodych myszy i wzrost kolców u starzejących się osobników.

(A) Schemat doświadczenia. Zwierzęta uśmiercono tuż po zakończonej adaptacji (Kontrola) lub po dwóch godzinach treningu (Trening). (B) Analiza zachowania przedstawia wzrost preferencji wizyt (i) i liżnięć (ii) do rogu z nagrodą w trakcie treningu. (C) Reprezentatywne zdjęcie grzbietowej części hipokampa myszy linii Thy1-GFP(M). Biała ramka wskazuje analizowany region (warstwa promienista pola CA1). Skala: 200 μm . (D) Stereologiczna analiza objętości hipokampów młodych i starych zwierząt. (i) Przykładowe rekonstrukcje 3D mysich hipokampów oraz (ii) zmierzona objętość zrekonstruowanych obrazów. (E) Reprezentatywne fotografie fragmentów dendrytów młodych i starych myszy linii Thy1-GFP(M) z grupy kontrolnej i trenowanej. Skala: 2 μm . (F) Gęstość liniowa kolców dendrytycznych. Dane na wykresie przedstawiają uśrednione pomiary z kilku zdjęć dla każdego zwierzęcia (Młode_Kontrola, liczba myszy/ ilość dendrytów = 4/ 20; Młode_Trening, myszy/ dendryty = 6/ 38; Stare_Kontrola, myszy/ dendryty = 4/ 22; Stare_Trening, myszy/ dendryty = 5/ 21). (G) Powierzchnia kolców dendrytycznych młodych i starzejących się myszy w grupie kontrolnej i po treningu. Wykres przedstawia indywidualne dane ze wszystkich przeanalizowanych kolców (Młode_Kontrola, liczba myszy/ ilość kolców dendrytycznych = 4/ 1112; Młode_Trening, myszy/ kolce = 6/ 2455; Stare_Kontrola, myszy/

kolce = 4/ 972; Stare_Trening, myszy/ kolce = 5/ 1158). **(H-J)** Dystrybucja wielkości kolców dendrytycznych u myszy młodych i starych, kontrolnych i trenowanych. Dla lepszego zobrazowania różnic pomiędzy grupami przedstawiono dane zlogarytmowane ($\log_{10}$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Na wykresach (B,D,ii,F) przedstawiono średnią $\pm$ SEM oraz medianę $\pm$ IQR dla (G). „A” na wykresach (B,i,ii) przedstawia preferencję do rogu w ostatnim dniu adaptacji (do tego samego rogu w którym na czas treningu umieszczono roztwór sacharozy i dla którego prezentowane są dane w kolejnych godzinach treningu).

4.4. Starzenie się wpływa na korelację pomiędzy poziomem białka synaptycznego PSD-95 a wielkością kolca dendrytycznego

PSD-95 jest kluczowym białkiem rusztowania synaptycznego w dojrzałych synapsach glutaminianergicznych (Aoki i in., 2001; Chen i in., 2011). Jego ekspresja jest regulowana w procesie plastyczności synaptycznej (Nowacka i in., 2020; Steiner i in., 2008), promuje trwałość kolców dendrytycznych (Ehrlich i in., 2007; El-Husseini i in., 2000; Meyer i in., 2014; Murmu i in., 2013) oraz wspiera trwałość wspomnień zależnych od hipokampa (Fitzgerald i in., 2015). Ze względu na jego funkcje w neuronach, przetestowałam czy ekspresja białka PSD-95 jest regulowana odmiennie u młodych i starych myszy podczas treningu wyboru miejsca.

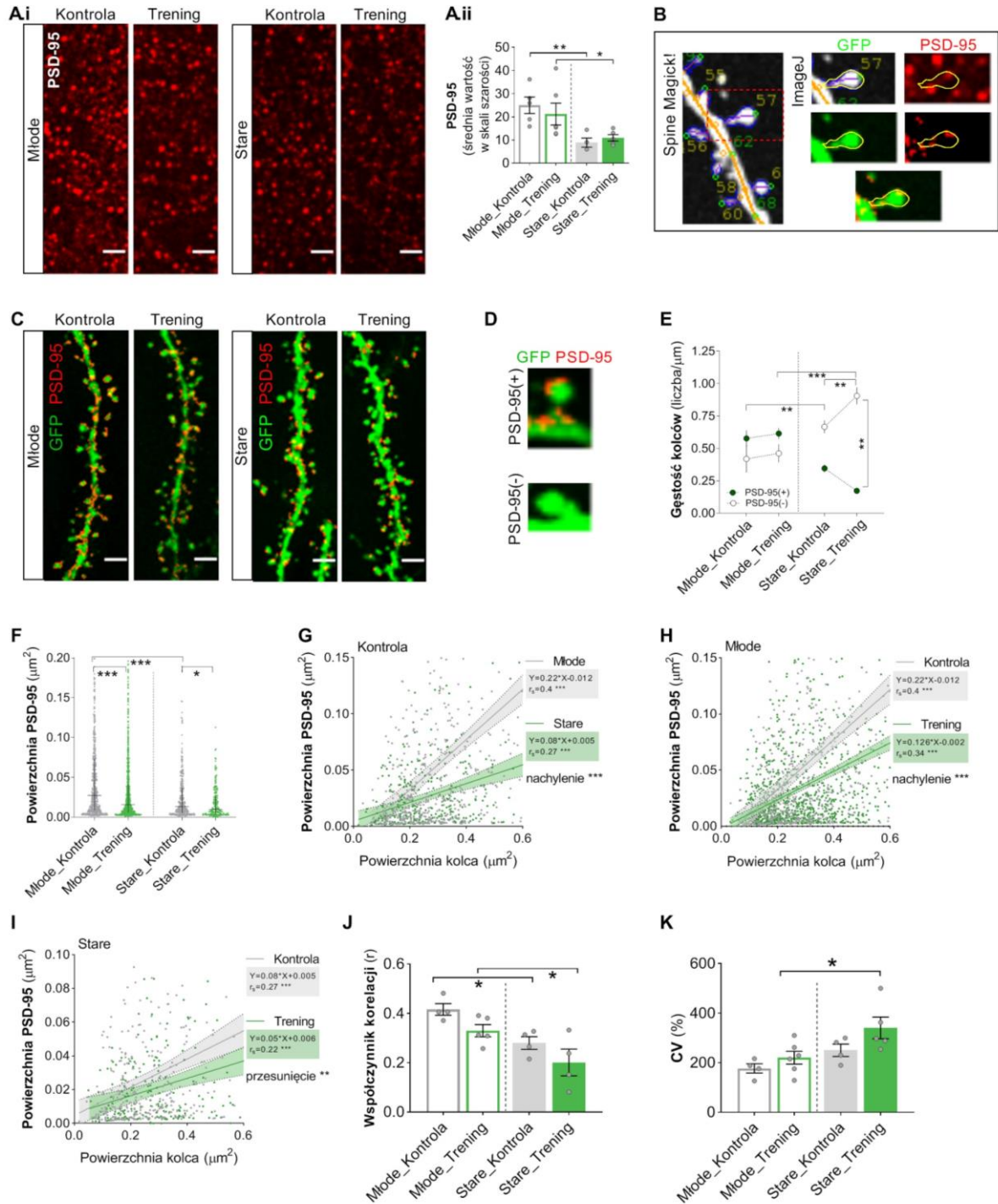
Aby zbadać, czy apetytywny trening przestrzenny powoduje zmiany w składzie białkowym synapsy wykonano barwienie immunofluorescencyjne na skrawkach mózgów pobranych od młodych i starych myszy z linii Thy1-GFP(M) (**Rycina 10A.i**). Zaobserwowałam, że na całkowity poziom białka PSD-95 ma wpływ wiek zwierząt (dwuczynnikowa ANOVA, $F_{1, 16} = 13,59$, $P = 0,002$), ale nie przebyty trening ($F_{1, 14} = 0,0597$, $P = 0,81$) (**Rycina 10A.ii**). Test *post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań potwierdził, że poziom białka PSD-95 w dCA1 u starych myszy jest niższy zarówno przed ($P = 0,008$), jak i po dwugodzinnym treningu ($P = 0,048$) w porównaniu do osobników młodych. Chcąc przyjrzeć się kolokalizacji białka PSD-95 z kolcami dendrytycznymi oraz wyróżnić kolce zawierające białko PSD-95 (PSD-95(+)) jak i pozbawione tego białka (PSD-95(-)), przeprowadzono analizę mikrofotografii w programie ImageJ (**Rycina 10C, D**). Dokładny sposób analizy opisano w rozdziale „3. Materiały i metody” oraz zaprezentowano na **Rycinie 10B**. Nie zaobserwowano wpływu wieku (trzechczynnikowa ANOVA, $F_{1, 29} = 0,01$, $P = 0,92$), ani treningu ($F_{1, 29} = 0,728$, $P = 0,401$) na gęstości kolców dendrytycznych. Jednak istotny wpływ na gęstość kolców miała ekspresja białka PSD-95 ($F_{1, 29} = 63,32$, $P < 0,001$) (**Rycina 10E**). Co więcej, istotna okazała się interakcja

między treningiem, wiekiem oraz obecnością białka PSD-95 ($F_{1, 29} = 5,912$, $P = 0,021$). Test *post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań potwierdził, że zarówno stare myszy z grupy kontrolnej ($P = 0,001$), jak i po treningu ($P < 0,001$) miały więcej kolców PSD-95(-), w porównaniu do młodych myszy kontrolnych lub trenowanych. Trening poszukiwania nagrody nie wpłynął na gęstość kolców PSD-95(+) i (-) u młodych myszy, ale istotnie zwiększył gęstość kolców PSD-95(-) u zwierząt starych ($P = 0,01$) (w porównaniu do starych zwierząt z grupy kontrolnej). U starych myszy po treningu odnotowano więcej kolców PSD-95(-) niż PSD-95(+) ($P = 0,001$), a stare osobniki miały mniej kolców PSD-95(+) niż zwierzęta młode ($P < 0,001$).

Następnie, określono ilość białka PSD-95 kolokalizującego z pojedynczym kolcem dendrytycznym i zaobserwowano istotny wpływ grupy eksperymentalnej na powierzchnię całkowitego PSD-95 na kolec (test Kruskala-Wallisa, $H = 75,64$, $P < 0,001$) (**Rycina 10F**). W grupie młodych myszy kontrolnych, średnia powierzchnia wszystkich punktów PSD-95 na pojedynczym kolcu była większa w porównaniu do starych zwierząt nie trenowanych ($0,027$ vs. $0,013 \mu\text{m}^2$) (test *post hoc* Dunna, $P < 0,001$), co wskazuje na obniżony poziom PSD-95 u starzejących się osobników. Ponadto, mediana powierzchni punktu PSD-95 była mniejsza w obu trenowanych grupach w porównaniu do ich odpowiednich kontrolnych grup wiekowych (Młode: $0,027$ vs. $0,015 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$; Stare: $0,013$ vs. $0,010 \mu\text{m}^2$, $P < 0,01$). Różnice te sugerują, iż trening prowadzi do zmniejszenia ilości białka PSD-95.

Wzrost kolców dendrytycznych oraz zmniejszenie się wielkości punktów PSD-95(+) u starych myszy pod wpływem treningu, sugeruje dekorelację tych parametrów. Aby zweryfikować czy zmiana ta zachodzi również na poziomie indywidualnych kolców dendrytycznych, porównałam stopień korelacji powierzchni punktów PSD-95(+) i wielkości kolca (korelacja rang Spearmana, r) (**Rycina 10G-I**). Analiza wykazała silną korelację obu tych parametrów we wszystkich testowanych grupach eksperymentalnych (korelacja Spearmana, $P < 0,001$ we wszystkich grupach), co dowodzi, że duże kolce charakteryzują się większą ekspresją białka PSD-95, niż kolce małe. Dodatkowo, zauważono istotną różnicę w nachyleniu linii regresji opisujących korelację w grupach kontrolnych młodych i starych zwierząt (ANCOVA, $F_{1, 822} = 21,82$, $P < 0,001$), co dowodzi że kolce dendrytyczne młodych myszy zawierają więcej PSD-95, niż kolce tej samej wielkości u starych zwierząt

(**Rycina 10G**). Różnica ta zależna jest od wielkości kolców dendrytycznych i jest najbardziej wyraźna w przypadku dużych kolców. Podobne przesunięcie linii regresji było obserwowane u młodych myszy po treningu w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej (nachylenie: $F_{1, 1517} = 26,30$, $P < 0,001$) (**Rycina 10H**). Nie znaleziono różnic w nachyleniu linii regresji u starych, trenowanych myszy w porównaniu do starych zwierząt z grupy kontrolnej ($F_{1, 536} = 2,783$, $P = 0,096$) (**Rycina 10I**). Spadek wysokości linii regresji w grupie starych myszy po treningu ($F_{1, 537} = 7,385$, $P = 0,007$) dowodzi, że kolce dendrytyczne tej samej wielkości zawierały mniej PSD-95, ale przesunięcie to nie zależy od wielkości kolca. Co więcej, zaobserwowano istotny wpływ wieku (dwuczynnikowa ANOVA, $F_{1, 13} = 15,38$, $P = 0,002$) i treningu ($F_{1, 13} = 5,983$, $P = 0,029$) na siłę korelacji wielkości punktów PSD-95(+) i kolca dendrytycznego (korelacja Spearmana, r), ale nie odnotowano różnic w interakcji obu zmiennych ($F_{1, 13} = 0,009$, $P = 0,925$) (**Rycina 10J**). Test *post hoc* LSD dla planowanych porównań potwierdził słabszą korelację powierzchni kolca dendrytycznego i wielkości PSD-95 u starzejących się zwierząt zarówno w grupie kontrolnej ($P = 0,016$), jak i trenowanej ($P = 0,016$) w porównaniu do młodych osobników. Ponadto, analiza współczynnika zmienności (CV) powierzchni kolca dendrytycznego i punktów PSD-95(+) pokazała istotny efekt wieku (dwuczynnikowa ANOVA, $F_{1, 15} = 9,275$, $P = 0,008$), niewielki efekt treningu ($F_{1, 15} = 4,374$, $P = 0,054$) i brak interakcji pomiędzy tymi czynnikami ($F_{1, 15} = 0,546$, $P = 0,471$) (**Rycina 10K**). Test *post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań dowiódł, iż stare myszy po treningu charakteryzują się większym współczynnikiem CV w porównaniu do młodych, trenowanych zwierząt ($P = 0,011$), co wskazuje na rosnącą wraz z wiekiem zmienność ilości PSD-95 w obrębie kolca dendrytycznego. Podsumowując, przedstawione dane dowodzą, że trening wywołał kurczenie się kolców dendrytycznych u młodych myszy, któremu towarzyszył obniżony poziom białka PSD-95. W przeciwieństwie do młodych zwierząt, trening starych osobników indukował wzrost kolców i kurczenie się powierzchni punktów PSD-95(+), co prowadziło do dekorelacji tych parametrów.



Rycina 10. Trening obniża ekspresję białka PSD-95 zarówno u młodych i starych myszy oraz destabilizuje korelację pomiędzy powierzchnią PSD-95 a powierzchnią kolca dendrytycznego u starych zwierząt.

(A) (i) Przykładowe fotografie barwienia immunofluorescencyjnego białka PSD-95 w warstwie promienistej CA1. Skala: 2 μm . (ii) Analiza ekspresji białka PSD-95 wyrażona w postaci MGCV (średnia wartość w skali szarości). (B) Panel prezentujący analizę kolców dendrytycznych w programie Spine Magick! oraz ich kolokalizację z fluorescencyjnie wyznakowanym białkiem PSD-95 w programie ImageJ. (C) Reprezentatywne zdjęcia ilustrujące kolokalizację fragmentu dendrytu znakowanego GFP i białka PSD-95. Skala: 2 μm .

(D) Przykładowe fotografie dwóch wyróżnionych kategorii kolców dendrytycznych: pozytywnych [PSD-95(+)] i negatywnych [PSD-95(-)] pod względem zawartości białka PSD-95. (E) Gęstość liniowa kolców pozytywnych i negatywnych pod względem obecności PSD-95. Wykres przedstawia dane dla poszczególnych zwierząt (Młode_Kontrola, liczba myszy/ ilość dendrytów = 4/ 20; Młode_Trening, myszy/ dendryty = 6/ 38; Stare_Kontrola, myszy/ dendryty = 4/ 22; Stare_Trening, myszy/ dendryty = 5/ 21). (F) Powierzchnia punktu PSD-95 przedstawiona jako suma powierzchni wszystkich punktów PSD-95 na każdym kolcu (Młode_Kontrola, liczba myszy/ ilość kolców dendrytycznych = 4/ 497; Młode_Trening, myszy/ kolce = 6/ 1024; Stare_Kontrola, myszy/ kolce = 4/ 329; Stare_Trening, myszy/ kolce = 5/ 214). (G-I) Korelacja powierzchni PSD-95 i kolca dendrytycznego u młodych i starych zwierząt, w grupie kontrolnej i trenowanej. (J) Współczynnik korelacji rang Spearmana pomiędzy kolcem dendrytycznym a powierzchnią PSD-95 (Młode_Kontrola $n = 4$, Młode_Trening $n = 5$, Stare_Kontrola $n = 4$, Stare_Trening $n = 4$). (K) Współczynnik zmienności (CV) oznaczający stosunek wielkości PSD-95 i powierzchni kolca dendrytycznego. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Na wykresach (A.ii,E,J,K) przedstawiono średnią $\pm$ SEM oraz medianę $\pm$ IQR dla (F). Wykresy (G-I) przedstawiają regresję liniową wraz z 95% przedziałami ufności.

4.5. Wybór przestrzenny i trening nieprzestrzenny wywołują powstawanie różnych wzorców plastyczności synaptycznej

Następnie badałam, czy zmiany synaptyczne obserwowane po treningu u młodych myszy, związane są z przestrzennymi czy nieprzestrzennymi aspektami treningu. W tym celu, młode dorosłe samice poddano treningowi poszukiwania nagrody bez aspektu przestrzennego (roztwór sacharozy w obu aktywnych rogach) lub przestrzennemu treningowi awersyjnemu (roztwór chininy w jednym rogu, woda w drugim). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta uśmiercone po adaptacji (**Rycina 11A**). Zaobserwowano istotny efekt treningu na zmianę preferencji wizyt i liżnięć (dwuczynnikowa ANOVA, wizyty: $F_{1,6} = 9,139$, $P = 0,023$; liżnięcia: $F_{1,6} = 9,356$, $P = 0,022$), ale brak efektu czasu (wizyty: $F_{1,363; 8,180} = 3,325$, $P = 0,098$; liżnięcia: $F_{1,294; 6,037} = 1,167$, $P = 0,342$) lub interakcji pomiędzy tymi czynnikami (wizyty: $F_{3,18} = 1,45$, $P = 0,262$; liżnięcia: $F_{3,14} = 3,085$, $P = 0,062$) na preferencję narożnika (**Rycina 11B.i, ii**). Myszy pijące roztwór sacharozy w obu rogach nie wykształciły preferencji przestrzennej w ciągu dwóch godzin treningu (*post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań, $P > 0,05$ dla wizyt i liżnięć w porównaniu: 2 godziny vs. adaptacja). W przeciwieństwie do treningu picia sacharozy, myszy poddane treningowi awersyjnemu istotnie zmniejszyły swoją preferencję do rogu z chininą ($P < 0,05$ dla wizyt i liżnięć w porównaniu: 2 godziny vs. adaptacja), co dowodzi powstawaniu przestrzennych i nieprzestrzennych wspomnień awersyjnych.

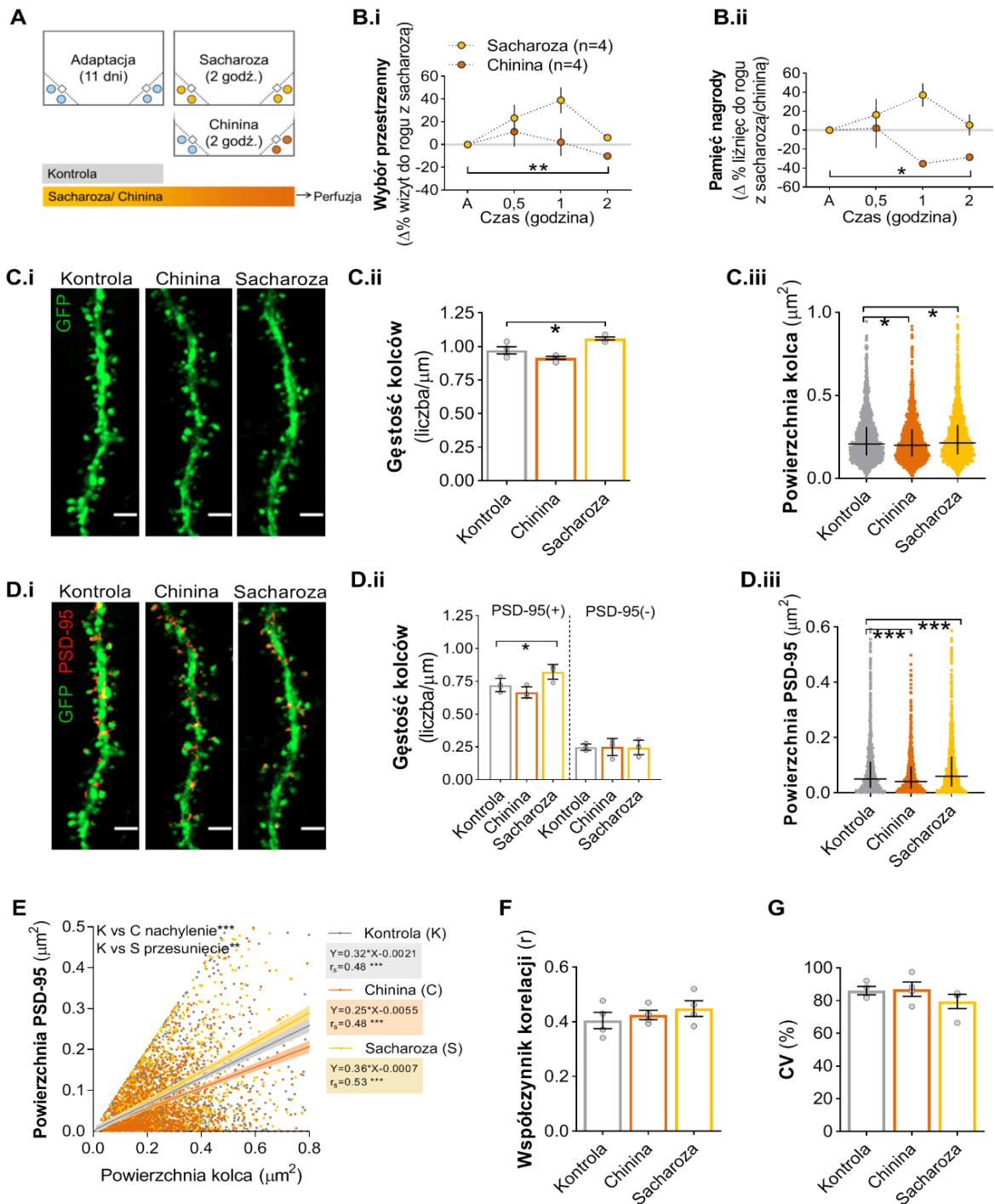
Analiza gęstości kolców dendrytycznych wykazała istotny efekt treningu (jednoczynnikowa ANOVA, $F_{2, 9} = 2,343$, $P < 0,001$) (**Rycina 11C.i, ii**). Gęstość kolców wzrosła w grupie spożywającej sacharozę w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej ($P = 0,015$), lecz nie odnotowano różnic w porównaniu grupy pijącej chininę i myszy kontrolnych ($P > 0,05$). Odnotowano spadek mediany powierzchni kolca w grupie spożywającej chininę w porównaniu do osobników kontrolnych ($0,207 \mu\text{m}^2$ vs. $0,198 \mu\text{m}^2$), podczas gdy w grupie mającej dostęp wyłącznie do sacharozy zaobserwowano jej wzrost ($0,207 \mu\text{m}^2$ vs. $0,213 \mu\text{m}^2$) (test Kruskala-Wallisa z *post hoc* Dunna, $U = 15,03$, $P < 0,001$) (**Rycina 11C.iii**).

Ponadto, zauważono wzrost częstotliwości występowania kolców PSD-95(+) w grupie zwierząt spożywających sacharozę w porównaniu do osobników kontrolnych ($P < 0,05$) i brak różnic w grupie z dostępem do chininy (dwuczynnikowa RM ANOVA z testem Tukeya dla wielokrotnych powtórzeń; efekt treningu: $F_{2, 9} = 15,27$, $P = 0,001$; PSD-95: $F_{1, 9} = 333,7$, $P < 0,001$; interakcja: $F_{2, 9} = 3,114$, $P = 0,094$) (**Rycina 11D.i-ii**). Myszy pijące chininę charakteryzowały się również zmniejszoną powierzchnią punktów PSD-95(+) przypadających na kolec dendrytyczny ($0,041 \mu\text{m}^2$) w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej ($0,050 \mu\text{m}^2$) ($P < 0,001$), podczas gdy spożycie sacharozy powodowało wzrost wielkości PSD-95 ($0,060 \mu\text{m}^2$) ($P < 0,001$) (**Rycina 11D.iii**) (test Kruskala-Wallisa z *post hoc* Dunna, $U = 50,89$, $P = 0,001$).

We wszystkich grupach eksperymentalnych zaobserwowano silną korelację między powierzchnią punktów PSD-95(+) i powierzchnią kolca dendrytycznego (korelacja Spearmana, $P < 0,001$ dla wszystkich grup) (**Rycina 11E**). Prosta regresji opisująca korelację w grupie pijącej chininę była przesunięta w dół i odmienna w nachyleniu, w porównaniu do zwierząt kontrolnych (ANCOVA, $F_{1, 2752} = 11,53$, $P < 0,001$), co dowodzi, że kolce dendrytyczne zwierząt eksponowanych na chininę miały stosunkowo mniejsze PSD niż zwierzęta kontrolne, a różnica ta była wyraźnie widoczna w kolcach o dużych rozmiarach. Linia regresji dla grupy z dostępem do sacharozy była przesunięta w górę w porównaniu do kontroli i różniła się uniesieniem (ANCOVA, $F_{1, 2924} = 7,345$, $P = 0,007$), co dowodzi powiększeniu PSD (**Rycina 11E**). Nie zaobserwowano istotnego wpływu treningu na siłę korelacji (jednoczynnikowa ANOVA, $F_{2, 9} = 0,704$, $P = 0,52$) (**Rycina 11F**) lub na współczynnik

zmienności CV wielkości punktów PSD-95(+) i powierzchni kolca dendrytycznego (jednoczynnikowa ANOVA, $F_{2,9} = 1,118$, $P = 0,368$) (**Rycina 11G**).

Podsumowując, uzyskane dane pokazują, że wzorce zmian synaptycznych obserwowane w grupach zwierząt poddanych treningowi przestrzennemu (sacharoza i chinina) były podobne i charakteryzowały się obniżeniem poziomu białka PSD-95 oraz kurczeniem się kolców dendrytycznych. W nieprzestrzennym treningu picia sacharozy doszło do powiększenia kolców i zwiększenia ilości PSD-95. We wszystkich grupach eksperymentalnych zmiany w powierzchni kolców dendrytycznych i punktów PSD-95(+) były skorelowane. Nasze dane sugerują zatem, że białko PSD-95 w dCA1 odgrywa istotną rolę zarówno w procesie dokonywania wyboru przestrzennego, jak i pamięci nieprzestrzennej u młodych myszy.



Rycina 11. Trening awersyjnego wyboru przestrzennego indukuje kurczenie się kolców dendrytycznych u młodych myszy, podczas gdy trening apetytywny nieprzestrzenny stymuluje ich wzrost.

(A) Schemat doświadczalny apetytywnego treningu położenia nagrody (słodki roztwór sacharozy w obu dostępnych narożnikach) oraz przestrzennego treningu awersyjnego (gorzki roztwór chininy w jednym narożniku) w klatce IntelliCage. Grupa kontrolna mająca dostęp do wody w obu narożnikach została uśmiercona po okresie adaptacji. (B) Myszy skutecznie nauczyły się unikać rogu z roztworem chininy, co ilustruje obniżona preferencja wykonywanych wizyt (i) do rogu z chininą oraz jej spożycie (ii). Młode myszy nie zmieniły

preferowanego rogu kiedy sacharoza była dostępna w obu narożnikach. (C) Analiza kolców dendrytycznych. (i) Przykładowe fotografie fragmentów dendrytów młodych myszy Thy1-GFP(M) pijących wodę (grupa kontrolna), roztwór chininy lub sacharozy. Skala: 2 μ m. Analiza (ii) gęstości kolców dendrytycznych przedstawiona jako średnia na osobnika (Kontrola, liczba myszy/ ilość dendrytów = 4/31; Chinina = 4/28; Sacharoza = 4/27) oraz (iii) powierzchni kolców dendrytycznych (dane na wykresie prezentowane dla indywidualnych kolców; Kontrola, liczba myszy/ ilość kolców = 4/2105; Chinina = 4/1653; Sacharoza = 4/1171). (D) Analiza kolców dendrytycznych zawierających białko PSD-95. (i) Przykładowe zdjęcia fragmentów dendrytów myszy Thy1-GFP(M) kolokalizujących z fluorescencyjnie wyznakowanym białkiem PSD-95. Skala: 2 μ m. (ii) Gęstość liniowa kolców dendrytycznych PSD-95(+) i PSD-95(-) (dane na wykresie przedstawione jako średnia na zwierzę; Kontrola, liczba myszy/ ilość dendrytów = 4/31; Chinina = 4/28; Sacharoza = 4/27) oraz (iii) powierzchnia punktu PSD-95 (prezentacja danych dla pojedynczych kolców; Kontrola, liczba myszy/ ilość kolców = 4/2105; Chinina = 4/1653; Sacharoza = 4/1171). (E) Korelacja wielkości PSD-95 i powierzchni kolca dendrytycznego u myszy z grupy kontrolnej oraz pijącej chininę lub sacharozę. Na wykresie zaprezentowano regresję liniową wraz z 95% przedziałami ufności. (F) Współczynnik korelacji Spearmana wielkości kolca dendrytycznego i powierzchni PSD-95. (G) Współczynnik zmienności przedstawiony dla indywidualnych myszy (Kontrola n = 4, Chinina n = 4, Sacharoza n = 4). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. Na wykresach (B.i,ii, C.ii, D.ii, F, G) przedstawiono średnią $\pm$ SEM oraz medianę $\pm$ IQR dla (C.iii, D.iii). Wykres (E) przedstawia regresję liniową wraz z 95% przedziałami ufności. „A” na wykresach (B.i,ii) przedstawia preferencję do rogu w ostatnim dniu adaptacji (do tego samego rogu w którym na czas treningu umieszczono roztwór sacharozy/chininy i dla którego prezentowane są dane w kolejnych godzinach treningu).

4.6. Rola PSD-95 w regionie dCA1 w dokonywaniu wyboru przestrzennego u młodych myszy

Wyciszenie ekspresji genu PSD-95 osłabia LTD zależne od receptorów NMDA (Ehrlich i in., 2007), a także zaburza pamięć przestrzenną, warunkowaną awersję smaku i proste uczenie asocjacyjne w postaci warunkowania instrumentalnego (Elkobi i in., 2008; Migaud i in., 1998; Nithianantharajah i in., 2013). Wciąż jednak nie wiadomo, jak starzenie się mózgu wpływa na plastyczność synaptyczną i procesy poznawcze zależne od białka PSD-95.

Aby zbadać funkcję białka PSD-95 w dCA1 w procesie wyboru przestrzennego, wykorzystano konstrukty lentiwirusowe (LV) kodujące krótkie sekwencje RNA o strukturze szpilki do włosów (shRNA) skierowane na sekwencję mRNA kodującą białko PSD-95 (LV: H1-shRNA_PSD-95-Ub-GFP) (shPSD95) (Schlüter i in., 2006). W grupie kontrolnej zastosowano wektor lentiwirusowy kodujący shRNA dla lucyferazy *Renilla* (LV:H1-shRNA_luciferase) (shLuc). Oba wektory wirusowe podano stereotaktycznie do dCA1 grupie młodych (5-miesięcznych) myszy C57BL/6cmdb

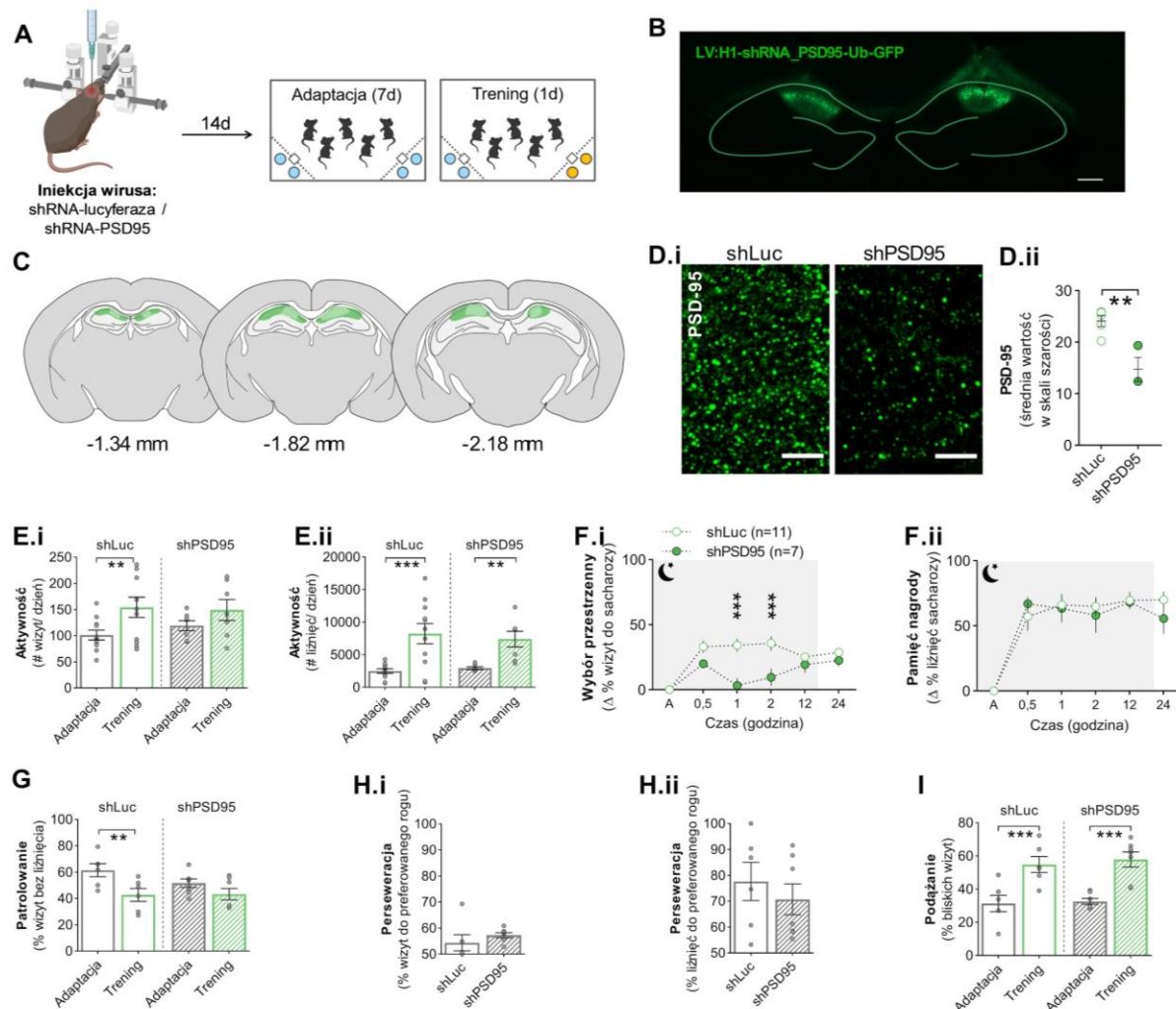
przed treningiem w klatce IntelliCage (**Rycina 12A**). Bilateralną ekspresję shPSD95 w dCA1 zaprezentowano na **Rycinie 12B**, a analiza przekrojów hipokampów potwierdziła, że ekspresja była ograniczona do dCA1 (Bregma > -2,5 mm) (**Rycina 12C**). Wydajność lokalnej transdukcji wirusem shPSD95 oszacowano na 32,5%, co skutecznie obniżyło poziom białka w regionie dCA1 (test t-Studenta, $t = 4,243$, $df = 6$, $P = 0,005$) (**Rycina 12D**). Ekspresja shPSD95 nie zaburzyła aktywności zwierząt i nie wpłynęła na spożycie płynów (**Rycina 12E**), co dowodzi braku poważnych zaburzeń zachowania. Aktywność i spożycie płynów wzrosły istotnie w czasie treningu w porównaniu do ostatniego dnia adaptacji (dwuczynnikowa RM ANOVA, efekt treningu: $F_{1, 16} = 15,59$, $P = 0,001$; liźnięcia: $F_{1, 16} = 31,6$, $P < 0,001$) (**Rycina 12E.i, ii**). Nie zaobserwowano jednak wpływu obniżenia ekspresji PSD-95 (wizyty: $F_{1, 16} = 0,099$, $P = 0,757$; liźnięcia: $F_{1, 16} = 0,022$, $P = 0,883$) lub interakcji pomiędzy dwoma czynnikami (wizyty: $F_{1, 16} = 1,211$, $P = 0,287$; liźnięcia: $F_{1, 16} = 0,505$, $P = 0,488$). Analiza *post hoc* Sidaka potwierdziła, że przebyty trening zwiększył częstotliwość wizyt ($P = 0,002$) i liźnień ($P < 0,001$) w grupie kontrolnej shLuc. Tymczasem, w grupie shPSD95 trening zwiększył dzienną liczbę wykonanych liźnień ($P = 0,013$), ale nie wizyt ($P > 0,05$). Zatem, obniżony poziom białka PSD-95 zapobiega wzrostowi aktywności młodych myszy podczas treningu.

Zaobserwowano istotny wpływ treningu na preferencję rogu z sacharozą, mierzoną jako zmianę częstotliwości wizyt (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 14,30$, $df = 1$, $P < 0,001$; trening: $F_{5, 77} = 15,59$, $P < 0,001$) i liźnień (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 31,62$, $df = 1$, $P < 0,001$; trening: $F_{3,031; 46,68} = 40,37$, $P < 0,001$) (**Rycina 12F.i, ii**). Dowodzi to, że młode zwierzęta z shPSD95 i shLuc tworzyły pamięć przestrzenną i nieprzestrzenną. Zauważono jednak, że miejscowe obniżenie ilości białka PSD-95 ($F_{1, 16} = 12,13$, $P = 0,003$) oraz interakcja czasu i wirusa ($F_{5, 77} = 5,82$, $P < 0,001$), wpływa na zmianę preferencji wizyt. Myszy z obniżonym poziomem PSD-95 wykazywały mniejszą preferencję do narożnika z sacharozą w początkowej fazie treningu, niż zwierzęta z grupy kontrolnej (test *post hoc* Sidaka dla wielokrotnych porównań, $P < 0,001$ dla 1. i 2. godzin) (**Rycina 12F.i**), co dowodzi zaburzeniom wyboru przestrzennego. Analiza preferencji liźnień nie wykazała istotnych różnic wynikających z wyciszenia ekspresji białka PSD-95 ($F_{1, 16} = 0,118$, $P = 0,736$) lub interakcji shRNA i czasu ($F_{5, 77} = 0,989$, $P = 0,43$), dowodząc że pamięć

nagrody u młodych myszy została zachowana pomimo obniżonego poziomu PSD-95 w dCA1 (**Rycina 12F.ii**).

Z uwagi na fakt, że patrolowanie narożników, wizyty perseweracyjne i interakcje społeczne wpływają na precyzję wyborów przestrzennych przeanalizowałam wpływ shPSD95 na te zachowania. Zaobserwowano istotny wpływ treningu (dwukierunkowa ANOVA, $F_{1, 11} = 21,68$, $P < 0,001$) i brak efektu wirusa shPSD95 ($F_{1, 11} = 0,75$, $P = 0,405$) lub interakcji shRNA i treningu ($F_{1, 11} = 3,156$, $P = 0,103$) na częstotliwość wizyt patrolujących (**Rycina 12G**). Test *post hoc* Sidaka wykazał jednak, że trening zmniejszył częstotliwość wizyt patrolujących tylko w grupie shLuc ($P = 0,002$), bez zmian w grupie shPSD95 ($P > 0,05$). Zmniejszenie zatem ilości białka PSD-95 w komórce, zapobiegło zmniejszeniu patrolowania w czasie treningu. Nie zauważono efektu obniżonego poziomu PSD-95 na częstość wizyt perseweracyjnych (test t-Studenta, $t = 0,956$, $df = 11$, $P = 0,36$) (**Rycina 12H.i**) oraz liżnięć ($t = 0,737$, $df = 11$, $P = 0,477$) w czasie adaptacji (**Rycina 12H.ii**). Ponadto, nie znaleziono też różnic pomiędzy grupami w ilości wykonanych wizyt społecznych ($F_{1, 11} = 0,199$, $P = 0,664$), ale odnotowano istotny wpływ treningu (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{1, 11} = 57,77$, $P < 0,001$) (**Rycina 12I**). Oznacza to, że obniżenie ekspresji PSD-95 w dCA1 specyficznie upośledza wybór przestrzenny bez ingerencji w inne testowane aspekty zachowania młodych myszy. Jak potwierdziły testy *post hoc*, podczas treningu w obu grupach eksperymentalnych zaobserwowano zwiększoną częstotliwość wizyt społecznych ($P < 0,001$ dla obu). Zatem, w przeciwieństwie do trenowanych oddzielnie młodych myszy (**Rycina 7**), trenowane razem młode samice z ekspresją shLuc i shPSD95 w dCA1, zwiększyły częstotliwość interakcji społecznych podczas treningu. Ta obserwacja potwierdza, że kontekst społeczny (stare myszy lub myszy z obniżonym poziomem PSD-95 w dCA1) wpływa na zachowania społeczne młodych zwierząt.

Podsumowując, nasze dane wskazują, że zmniejszenie poziomu białka PSD-95 w dCA1 zaburzyło proces dokonywania wyboru przestrzennego u młodych myszy. Co ciekawe, zmniejszenie ilości PSD-95 zapobiegło także wzrostowi aktywności myszy wywołanej treningiem i zmniejszeniu liczby wizyt patrolujących. Ze względu na fakt, iż parametry te nie różniły się między grupami eksperymentalnymi (shLuc vs. shPSD95) podczas treningu, upośledzenie to nie może wyjaśnić niewłaściwych wyborów przestrzennych w grupie młodych samic z ekspresją shPSD95.



Rycina 12. Obecność białka PSD-95 jest niezbędna do dokonania wyboru przestrzennego u młodych myszy.

(A) Schemat doświadczenia. Po iniekcji lentiwirusa kodującego shRNA specyficzne dla PSD-95 (LV: H1-shRNA_PSD95-Ub-GFP) (shPSD95) lub lucyferazy *Renilla* (LV: H1-shRNA_luciferaza) (shLuc) do pola CA1 hipokampa, myszy poddano treningowi w klatce IntelliCage. Początkowo, zwierzęta przeszły fazę adaptacji do klatki z wodą dostępną w obu rogach, a następnie w fazie treningu przestrzennego, woda w jednym narożniku została zastąpiona roztworem sacharozy. (B) Przykładowe zdjęcie obrazujące grzbietowy hipokamp myszy z widoczną miejscową nadekspresją wirusa kodującego shRNA skierowane przeciwko PSD-95. Skala: 100 μ m. (C) Schemat przedstawiający zasięg transfekcji shPSD95 w regionie CA1. Przedstawiono minimalne i maksymalne transfekcje. (D) (i) Przykładowe zdjęcia przedstawiające barwienie immunofluorescencyjne białka PSD-95 u młodych myszy. Skala: 5 μ m. (ii) Obniżona ekspresja PSD-95 w polu CA1 hipokampa młodych zwierząt w wyniku wyciszenia genu za pomocą shPSD95. Intensywność fluorescencji wyrażona w postaci MG – średnia wartość w skali szarości. (E) Dzienna liczba wizyt (i) i liżnięć (ii) z obu dostępnych rogów klatki IntelliCage wykonana przez myszy młode w czasie adaptacji i treningu. (F) Wyciszenie ekspresji PSD-95 w polu CA1 obniża skuteczność odnalezienia nagrody u młodych myszy (i), ale nie wpływa na preferencję spożycia sacharozy (ii). Częstotliwość (G) wizyt patrolujących (bez liżnięcia), (H) (i) wizyt i (ii) liżnięć perseweracyjnych (do

preferowanego rogu) oraz (I) wizyt społecznych (podążanie za innym osobnikiem do tego samego rogu w czasie < 1 sekunda) w czasie adaptacji i treningu. **P < 0,01, ***P < 0,001. Na wykresach przedstawiono średnią ± SEM. „A” na wykresach (F.i,ii) przedstawia preferencję do rogu w ostatnim dniu adaptacji (do tego samego rogu w którym na czas treningu umieszczono roztwór sacharozy i dla którego prezentowane są dane w kolejnych godzinach treningu).

4.7. Rola seryny 73 PSD-95 w dokonywaniu wyboru przestrzennego u młodych myszy

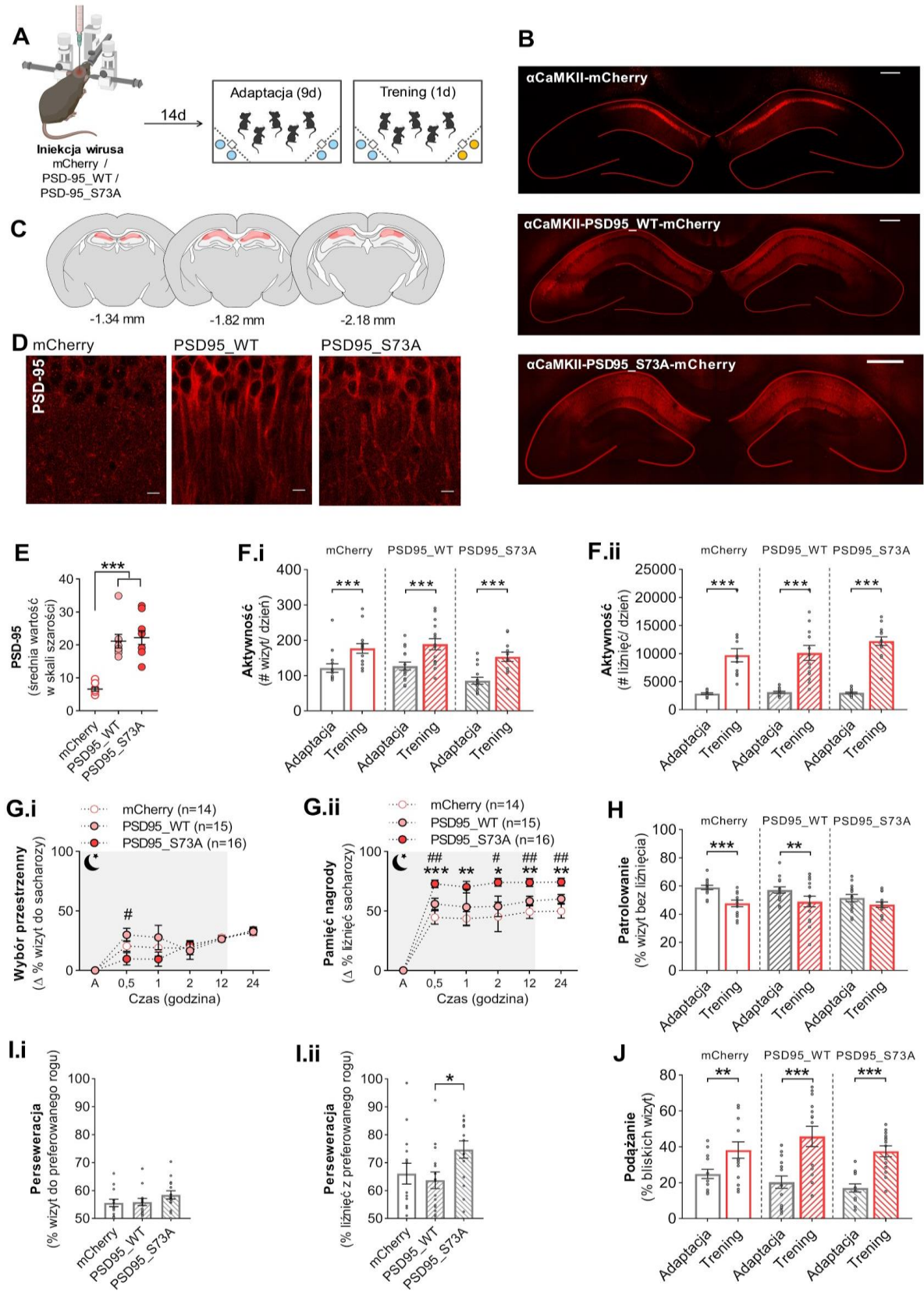
Kolejnym celem pracy było zbadanie skutków zaburzenia plastyczności strukturalnej zagęszczenia postsynaptycznego w procesie dokonywania wyboru przestrzennego. Fosforylacja PSD-95 na serynie 73 przez CaMKII, promuje przebudowę kolca dendrytycznego i PSD (Steiner i in., 2008) oraz obniża asocjacje PSD-95 z NMDAR (Gardoni i in., 2006). Nadprodukcja PSD-95 w wariancie w którym nie może ulec fosforylacji (PSD95_S73A), a następnie eliminacji z synapsy, powoduje jej nadmierną stabilność i wzmożony wzrost kolca.

Aby ocenić rolę zaburzenia mobilności PSD-95 w synapsach dCA1 w tworzeniu pamięci, dorosłym (4-miesięcznym) samicom C57BL/6cmdb podano wektory wirusowe zasocjowane z adenowirusem (ang. *adeno-associated virus*, AAV) kodujące różne warianty badanego białka. Stereotaktyczna iniekcja wirusów AAV w regionie dCA1 hipokampa przed treningiem w klatce IntelliCage (**Rycina 13A**), spowodowała nadprodukcję białka PSD-95 w formie natywnej (α CaMKII-PSD95_WT-mCherry) oraz zmutowanej z punktową substytucją seryny (S) 73 na alaninę (A) (α CaMKII-PSD95_S73A-mCherry) (jednoczynnikowa ANOVA, $F_{2, 22} = 24,3$, $P < 0,001$) (**Rycina 13B-E**). Grupie kontrolnej podano wirus α CaMKII-mCherry, powodujący syntezę białka czerwonej fluorescencji mCherry. Test *post hoc* Tukeya dla porównań wielokrotnych dowiódł istotny wzrost poziomu białka PSD-95 w obu grupach po iniekcji wektorów wprowadzających do komórki dodatkowe kopie genu *Dlg4*, w porównaniu do grupy kontrolnej mCherry (mCherry vs. PSD95_WT $P > 0,001$, mCherry vs. PSD95_S73A $P > 0,001$). Wydajność transdukcji wirusowej w komórkach warstwy piramidowej (StPyr) oszacowano na 69,1% dla wirusa kontrolnego mCherry, 62,3% w przypadku wirusa PSD95_WT i 63,6% dla grupy PSD95_S73A. Ekspresja obu wirusów wprowadzających egzogenne białko PSD-95 do komórki, nie zaburzyła aktywności zwierząt i nie wpłynęła na spożycie płynów w czasie adaptacji

(**Rycina 13F**), co dowodzi braku poważnych zaburzeń zachowania. Dzienna liczba wszystkich wykonanych wizyt w klatce IntelliCage wzrosła w trakcie treningu we wszystkich badanych grupach (dwuczynnikowa ANOVA, efekt treningu: $F_{1, 40} = 124,3$, $P < 0,001$) oraz nie zaobserwowano różnic związanych z nadekspresją PSD-95 ($F_{2, 40} = 2,816$, $P = 0,072$) (**Rycina 13F.i**). Dobowa liczba wszystkich wykonanych liźnięć w klatce IntelliCage wzrosła w trakcie treningu we wszystkich badanych grupach (dwuczynnikowa ANOVA, efekt treningu: $F_{1, 40} = 162,1$, $P < 0,001$) i nie zaobserwowano różnic związanych z nadekspresją PSD-95 ($F_{2, 40} = 1,238$, $P = 0,301$) (**Rycina 13F.ii**). Zaobserwowano natomiast istotny wpływ czasu na preferencję rogu z sacharozą (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 10,32$, $df = 1$, $P < 0,001$; trening: $F_{3,155; 118,6} = 25,04$, $P < 0,001$) i preferencję liźnięć (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 81,74$, $df = 1$, $P < 0,001$; trening: $F_{2,641; 95,60} = 125,7$, $P < 0,001$) w czasie treningu (**Rycina 13G.i, ii**). Dowodzi to, że niezależnie od wariantu wektora wirusowego, wszystkie myszy dokonywały trafnych wyborów przestrzennych i tworzyły pamięć nagrody. Nie zauważono znaczącego wpływu nadekspresji PSD-95 ($F_{2, 40} = 1,127$, $P = 0,343$), ani interakcji czasu i wirusa ($F_{10, 188} = 1,737$, $P = 0,075$) na zmianę preferencji wizyt. Jak wykazały testy *post hoc* lokalna nadprodukcja PSD95_S73A spowodowała jednak mniejszy wzrost preferencji rogu z nagrodą na początkowym etapie treningu w porównaniu do grupy z natywną formą białka (PSD95_WT) (test *post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań: (0,5 godz.)_PSD95_WT vs. PSD95_S73A $P = 0,014$) (**Rycina 13G.i**). Nadprodukcja białka PSD-95 miała również wpływ na preferencję sacharozy ($F_{2, 40} = 7,613$, $P = 0,002$) oraz interakcję między wirusem i czasem ($F_{10, 181} = 2,689$, $P = 0,004$) (**Rycina 13G.ii**). Zwiększona ilość natywnego białka PSD-95 nie wpłynęła istotnie na preferencję sacharozy (*post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań, $P > 0,05$), lecz co ciekawe, obecność zmutowanej formy białka PSD-95, spowodowała większą zmianę preferencji sacharozy w trakcie treningu w porównaniu do grupy kontrolnej (*post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań, mCherry vs. PSD95_S73A: (0,5 godz.) $P < 0,001$, (1 godz.) $P = 0,003$, (2 godz.) $P = 0,042$, (12 godz.) $P = 0,001$, (24 godz.) $P = 0,002$). Zauważono także różnice w preferencji liźnięć między dwoma grupami z wirusami PSD-95 (PSD95_WT vs. PSD95_S73A: (0,5 godz.) $P = 0,007$, (2 godz.) $P = 0,045$, (12 godz.) $P = 0,006$, (24 godz.) $P = 0,008$). Zatem osobniki z nadprodukcją zmutowanej formy białka

PSD-95 wykazywały większą zmianę preferencji picia z rogu z sacharozą niż pozostałe osobniki.

Dodatkowo zaobserwowano istotny wpływ treningu (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{1, 40} = 32,88$, $P < 0,001$) i brak efektu podanego wirusa ($F_{2, 40} = 1,132$, $P = 0,332$) lub interakcji wirusa i treningu ($F_{2, 40} = 1,711$, $P = 0,194$) na częstotliwość wizyt patrolujących (**Rycina 13H**). Myszy z grupy kontrolnej i z nadekspresją PSD95_WT wykonały w trakcie treningu mniej wizyt niezakończonych liżnięciem, podczas gdy różnica między adaptacją i treningiem w grupie myszy po iniekcji PSD95_S73A pozostała nieistotna statystycznie. Obniżona częstotliwość wizyt tego typu w czasie treningu w grupie mCherry i PSD95_WT dowodzi, że podobnie jak przedstawiono na **Rycinie 7**, młode osobniki ograniczają zwyczajową eksplorację klatki, natomiast u zwierząt z ekspresją zmutowanej formy PSD-95 zmiana taka nie zaszła. Nie zauważono efektu zwiększonej ekspresji PSD-95 na częstość wizyt perseweracyjnych (jednoczynnikowa ANOVA, $F_{2, 40} = 1,322$, $P = 0,278$) oraz liżnięć ($F_{2, 40} = 3,119$, $P = 0,055$) w czasie adaptacji, choć efekt ten jest bliski istotności statystycznej (**Rycina 13I.i, ii**). Zwierzęta z nadprodukcją zmutowanego białka PSD-95 istotnie częściej piły z jednego narożnika (**Rycina 13I.ii**) (*post hoc* LSD dla zaplanowanych porównań, PSD95_WT vs. PSD95_S73A $P = 0,022$), co dowodzi że osobniki te mają tendencję do zachowań perseweracyjnych (**Rycina 13G.ii, I.ii**) i obniżoną tendencję do swobodnej eksploracji (**Rycina 13H**). Nie znaleziono różnic pomiędzy grupami w ilości wizyt społecznych (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{2, 40} = 0,8602$, $P = 0,431$), ale odnotowano istotny wpływ treningu ($F_{1, 40} = 68,19$, $P < 0,001$) (**Rycina 13J**). Oznacza to, że nadprodukcja zmutowanego białka PSD-95 w dCA1 specyficznie upośledza podejmowanie decyzji przestrzennych we wczesnych fazach treningu, skłania młode myszy do bardziej perseweracyjnych zachowań oraz ogranicza spontaniczne patrolowanie przestrzeni.



Rycina 13. Obecność funkcjonalnego białka PSD-95 jest niezbędna do prawidłowego kształtowania pamięci przestrzennej u młodych myszy oraz naturalnego patrolowania środowiska i hamowania rozwoju nawykowych zachowań perseweracyjnych.

(A) Schemat doświadczalny. Młode myszy poddano iniekcji adenowirusa kontrolnego z fluorescencyjnym białkiem mCherry (AAV: CaMKII-mCherry) (mCherry) lub wirusa powodującego nadprodukcję natywnego (AAV: CaMKII-PSD95-WT-mCherry) (PSD95_WT) lub zmutowanego białka PSD-95 z punktową substytucją seryny 73 na alaninę (AAV: CaMKII-PSD95_S73A-mCherry) (PSD95_S73A) do dCA1. Po 14 dniach od operacji, myszy poddano treningowi w klatce IntelliCage. Początkowo, zwierzęta przeszły fazę adaptacji do klatki z wodą dostępną w obu rogach, a następnie w fazie treningu przestrzennego, woda w mniej preferowanym narożniku została zastąpiona słodkim roztworem sacharozy. (B) Przykładowe zdjęcia obrazujące grzbietowy hipokamp myszy z widoczną miejscową ekspresją adenowirusów i nadprodukcją białka PSD-95. Skala: 100 μ m. (C) Schemat przedstawiający zasięg transfekcji wirusowej w regionie CA1. Przedstawiono minimalne i maksymalne transfekcje. (D) Zdjęcia przedstawiające barwienie immunofluorescencyjne białka PSD-95 u młodych myszy w warstwie promienistej pola CA1. Skala: 10 μ m. (E) Lokalna nadprodukcja białka PSD-95 w dCA1 w grupach po transdukcji dodatkowej kopii genu PSD-95. Intensywność fluorescencji wyrażona w postaci MGv – średnia wartość w skali szarości. (F) Dzienna liczba wizyt (i) i liżnięć (ii) z obu dostępnych rogów klatki IntelliCage wykonana przez myszy w czasie adaptacji i treningu. (G) (i) Nadekspresja natywnej formy białka PSD-95 (WT) nie wpływa na skuteczność odnalezienia nagrody u młodych myszy, natomiast wprowadzenie do komórek hipokampa w dCA1 zmutowanej formy genu (S73A) obniżyło skuteczność treningu w jego początkowej fazie. (ii) Nadprodukcja PSD95_WT nie wpłynęła na preferencję spożycia sacharozy, natomiast zmutowana forma białka wzmocniła preferencję konsumpcji sacharozy. Częstotliwość (H) wizyt patrolujących (bez liżnięcia), (I) (i) wizyt i (ii) liżnięć perseweracyjnych (do preferowanego rogu) oraz (J) wizyt społecznych (podążanie za innym osobnikiem do tego samego rogu w czasie < 1 sekunda) w czasie adaptacji i treningu. *, # P < 0,05, **, ## P < 0,01, *** P < 0,001. Istotności oznaczone „*” przedstawiają porównanie grup mCherry vs. PSD95_S73A, a oznaczenie „#” dotyczy porównania PSD95_WT vs. PSD95_S73A. Na wykresach przedstawiono średnią $\pm$ SEM. „A” na wykresach (F) przedstawia preferencję do rogu w ostatnim dniu adaptacji (do tego samego rogu w którym na czas treningu umieszczono roztwór sacharozy i dla którego prezentowane są dane w kolejnych godzinach treningu).

4.8. Funkcja PSD-95 w regionie dCA1 w dokonywaniu wyboru przestrzennego u starzejących się samic myszy

Ze względu na istotną rolę białka PSD-95 w dokonywaniu wyboru przestrzennego u młodych myszy (**Rycina 12**), a zarazem jego obniżony poziom w dCA1 starych osobników (**Rycina 10**), postanowiłam zbadać rolę tego białka w podejmowaniu decyzji przestrzennych u myszy starych.

W tym celu, podobnie jak w doświadczeniu z młodymi osobnikami (**Rycina 12**), wykorzystano wektory lentiwirusowe kodujące shPSD95 oraz shLuc w grupie kontrolnej. Wektory wirusowe podano drogą mikroiniekcji stereotaktycznej do dCA1 grupie starych (22-miesięcznych) myszy C57BL/6cmdb przed treningiem

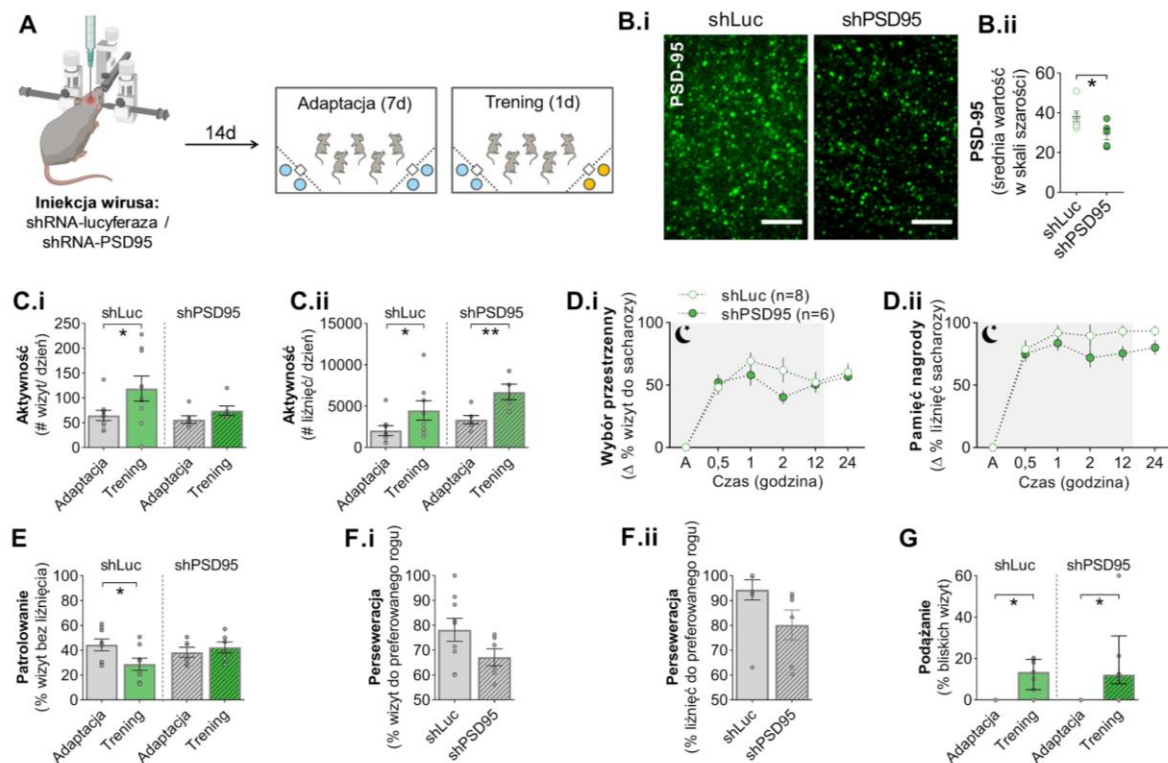
w klatce IntelliCage (**Rycina 14A**). Lokalna ekspresja shPSD95 skutecznie obniżyła poziom białka w regionie dCA1 u starych myszy (test t-Studenta, $t = 2,292$, $df = 9$, $P = 0,048$) (**Rycina 14B**). Podobnie do młodych osobników, ekspresja shPSD95 nie wywołała poważnych zaburzeń zachowania i nie zmieniła aktywności zwierząt oraz spożycia płynów (**Rycina 14C**). Aktywność starych myszy wzrosła istotnie w czasie treningu w porównaniu do ostatniego dnia adaptacji pod względem ilości wykonanych wizyt (dwuczynnikowa RM ANOVA z testem LSD Fishera dla planowanych porównań, efekt treningu: $F_{1, 13} = 7,844$, $P = 0,015$) (**Rycina 14C.i**) i liżnięć ($F_{1, 12} = 27,10$, $P < 0,001$) (**Rycina 14C.ii**). Nie zaobserwowano efektu shPSD95 (wizyty: $F_{1, 13} = 1,553$, $P = 0,235$; liżnięcia: $F_{1, 12} = 2,457$, $P = 0,143$) lub interakcji pomiędzy czynnikami (wizyty: $F_{1, 13} = 1,946$, $P = 0,184$; liżnięcia: $F_{1, 12} = 0,669$, $P = 0,429$). Analiza *post hoc* testem Sidaka wykazała, że o ile w grupie shLuc zarówno wizyty, jak i liżnięcia były częstsze podczas treningu w porównaniu z adaptacją ($P = 0,011$ dla obu), to w grupie shPSD95 trening zwiększył tylko liczbę liżnięć (liżnięcia: $P = 0,004$; wizyty: $P > 0,05$). Zatem obniżenie poziomu PSD-95 zapobiegło wzrostowi aktywności starych myszy w czasie treningu.

Co ciekawe, doświadczenie ze starymi osobnikami pokazało jedynie istotny wpływ czasu ($F_{5, 55} = 52,59$, $P < 0,001$) na preferencję wizyt, bez efektu podanego shRNA ($F_{1, 12} = 0,77$, $P = 0,40$) lub interakcji pomiędzy shRNA i czasem ($F_{5, 55} = 1,912$, $P = 0,107$) (**Rycina 14D.i**). Dodatkowo, zaobserwowano również istotny wpływ czasu (analiza modeli mieszanych, $\chi^2 = 21,56$, $df = 1$, $P < 0,001$; trening: $F_{1,977; 21,35} = 137,4$, $P < 0,001$), bez efektu shRNA ($F_{1, 12} = 2,93$, $P = 0,113$) lub interakcji pomiędzy dwoma czynnikami ($F_{5, 54} = 1,362$, $P = 0,253$) na preferencję spożycia płynów (**Rycina 14D.ii**). Dane te pokazują, że obniżenie poziomu białka PSD-95 u starych myszy nie wpłynęło na ich wybór przestrzenny ani pamięć nagrody. Brak istotnych różnic w treningu pomiędzy grupami shLuc i shPSD95 pod względem preferencji narożnika z nagrodą, został również potwierdzony testami *post hoc* Sidaka. Obniżenie poziomu białka PSD-95 u starych osobników, nie wpłynęło ani na dokonywany przez nie wybór przestrzenny, ani na pamięć nagrody.

W analizie częstotliwości wizyt patrolujących, nie stwierdzono wpływu czasu (dwuczynnikowa RM ANOVA, $F_{1, 12} = 2,608$, $P = 0,132$), shRNA ($F_{1, 13} = 0,457$, $P = 0,512$) lub interakcji czasu i wektora wirusowego ($F_{1, 12} = 7,427$, $P = 0,018$) (**Rycina 14E**). Testy *post hoc* Sidaka potwierdziły jednak, że częstotliwość wizyt

patrolujących zmniejszyła się podczas treningu w grupie shLuc ($P = 0,012$), ale nie wśród zwierząt z shPSD95 ($P > 0,05$), co wskazuje, że obniżenie poziomu tego białka, hamuje typowo obserwowane zjawisko zmniejszonego patrolowania klatki w czasie treningu. Nie zaobserwowano istotnej różnicy między grupami shPSD95 i shLuc w częstości wizyt perseweracyjnych (test t-Studenta, $t = 1,727$, $df = 13$, $P = 0,108$) i liżnięciach z preferowanego rogu ($t = 2,036$, $df = 13$, $P = 0,063$) (**Rycina 14F.i, ii**). Na koniec zaobserwowaliśmy istotny wpływ treningu na częstość wizyt społecznych, zarówno w grupie shLuc (test sumy rang (kolejności par) Wilcoxona, $P = 0,031$), jak i shPSD95 ($P = 0,031$) (**Rycina 14G**).

Podsumowując, nasze dane wskazują, że obniżenie poziomu białka PSD-95 w dCA1 zaburzyło proces dokonywania wyboru przestrzennego u młodych myszy, ale nie miało istotnego wpływu na decyzje przestrzenne starszych zwierząt. Co istotne, zmniejszenie ilości PSD-95 zapobiegło także wzrostowi aktywności myszy wywołanej treningiem i zmniejszeniu liczby wizyt patrolujących niezależnie od wieku zwierząt.



Rycina 14. Obecność białka PSD-95 nie jest niezbędna do dokonania wyboru przestrzennego u starzejących się osobników.

(A) Schemat doświadczenia. Po iniekcji lentiwirusa kodującego shRNA specyficzne dla PSD-95 (LV: H1-shRNA_PSD95-Ub-GFP) (shPSD95) lub lucyferazy *Renilla* (LV: H1-shRNA_lucyferaza) (shLuc) do pola CA1 hipokampa, myszy poddano treningowi w klatce IntelliCage. Początkowo, zwierzęta przeszły fazę adaptacji do klatki z wodą dostępną w obu rogach, a następnie w fazie treningu przestrzennego, woda w jednym narożniku została zastąpiona roztworem sacharozy. (B) (i) Przykładowe zdjęcia przedstawiające barwienie immunofluorescencyjne białka PSD-95 u starzejących się myszy. Skala: 5 μ m. (ii) Obniżona ekspresja PSD-95 w polu CA1 hipokampa starych zwierząt w wyniku wyciszenia genu za pomocą shPSD95. Intensywność fluorescencji wyrażona w postaci MG – średnia wartość w skali szarości. (C) Aktywność starzejących się osobników podczas adaptacji i treningu. Dzienna liczba wizyt (i) i liżnięć (ii) z obu dostępnych rogów. (D) Wyciszenie ekspresji PSD-95 w polu CA1 obniża skuteczność odnalezienia nagrody (i) i preferencję spożycia sacharozy (ii) u starych zwierząt. Częstotliwość (E) wizyt patrolujących (bez liżnięcia), (F) (i) wizyt i (ii) liżnięć perseweracyjnych (do preferowanego rogu) oraz (G) wizyt społecznych (podążanie za innym osobnikiem) w czasie adaptacji i treningu. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Na wykresach (B-F) przedstawiono średnią $\pm$ SEM, na (G) medianą $\pm$ IQR. „A” na wykresach (D.i,ii) przedstawia preferencję do rogu w ostatnim dniu adaptacji (do tego samego rogu w którym na czas treningu umieszczono roztwór sacharozy i dla którego prezentowane są dane w kolejnych godzinach treningu).

5. Dyskusja

Celem tej pracy było zbadanie, w jaki sposób starzenie się wpływa na strategie behawioralne i procesy synaptyczne w regionie CA1 grzbietowego hipokampa, które wspierają dokonywanie wyboru przestrzennego. W ramach niniejszej rozprawy, przetestowano w jaki sposób młode i stare samice myszy żyjących w grupie podejmują decyzje przestrzenne. Przeprowadzono także analizę morfologii kolców dendrytycznych oraz poziomu synaptycznego białka PSD-95 w dCA1 w czasie treningu decyzji przestrzennych. Na koniec analizowano w jaki sposób białko PSD-95 w dCA1 wpływa na podejmowanie decyzji przestrzennych.

5.1. Plastyczność neuronalna w dCA1 wpływa na dokonywanie wyborów przestrzennych

Umiejętność kojarzenia zdarzeń z określonymi miejscami, czyli pamięć asocjacyjna, jest niezbędna dla przetrwania wszystkich gatunków zwierząt. Powszechnie uważa się, że plastyczność synaptyczna zależna od NMDAR w dCA1 przyczynia się do tworzenia pamięci asocjacyjnej (Bliss i Collingridge, 1993) oraz długotrwałej pamięci przestrzennej (Martin i in., 2000). Jednocześnie w kluczowych pracach przeglądowych można przeczytać, że choć hipoteza plastyczności synaps i pamięci jest zapisana w większości podręczników neuronauk, to problem ten jest nadal daleki od rozwiązania (Neves i in., 2008). Udział plastyczności synaptycznej zależnej od NMDAR w dCA1 w regulacji pamięci przestrzennej, został na przykład zakwestionowany przez Bennermana i jego współpracowników (2012, 2014). Autorzy wykazali, że myszy z lokalną lezją NMDAR w dCA1 sprawnie tworzą pamięć przestrzenną w teście basenu Morrisa. Mutacja ta zaburza jednak proces dokonywania wyborów przestrzennych – wybór właściwego ramienia w labiryncie T lub właściwej latarni w teście basenu Morrisa (2012). Doświadczenia te nie kwestionują udziału plastyczności synaptycznej zależnej od NMDAR w tworzeniu pamięci, jednak jasno pokazują, że plastyczność synaptyczna specyficznie w dCA1 nie jest konieczna do powstawania pamięci przestrzennej.

Przedstawione przeze mnie dane dowodzą, że plastyczność synaptyczna zależna od białka PSD-95 w dCA1 jest ważna w procesie dokonywania wyboru

przestrzennego, a nie dla pamięci przestrzennej. W zastosowanym przeze mnie modelu badawczym, myszy żyjące w grupie poddano treningowi wyboru przestrzennego pomiędzy dwoma identycznymi narożnikami klatki IntelliCage. Uzyskane dane pokazały, że zarówno trening apetytywny, jak i awersyjny młodych osobników, indukował podobne zmiany synaptyczne w dCA1, które różnią się od zmian synaptycznych wywołanych przez trening nagrody, który nie miał komponenty przestrzennej. Ponadto, wybór przestrzenny u młodych myszy jest upośledzony przez miejscowe obniżenie ilości synaptycznego białka PSD-95 w dCA1. Manipulacja ta nie wpłynęła na pamięć nagrody, nawykowe patrolowanie lub persewerację. Przedstawione dane potwierdzają zatem rolę plastyczności synaptycznej zależnej od PSD-95 w polu CA1 grzbietowej części hipokampa w wyborze przestrzennym młodych zwierząt. Co ciekawe, obniżenie poziomu PSD-95 w dCA1 nie wpłynęło na wybór przestrzenny u starych myszy, co sugeruje że neuronalne podstawy dokonywania wyboru przestrzennego zmieniają się wraz z wiekiem.

Ciekawą obserwacją jest rozbieżna czasowo dynamika skutków działania nadprodukcji PSD95_S73A oraz zmniejszenia ilości PSD-95 za pomocą shRNA. Istotne różnice w zachowaniu zwierząt ze zwiększonym poziomem PSD95_S73A widoczne był już na samym początku treningu (w czasie pierwszych 30 minut) (**Rycina 13G.i**), podczas gdy efekt obniżonej ilości PSD-95 u młodych samic, obserwowano nieco później, bo w pierwszej i drugiej godzinie treningu (**Rycina 12F.i**). W efekcie stymulacji neuronu następuje przebudowa rusztowania PSD-95 przez oddysocjowanie tego białka od receptorów NMDA, powodując ich otwarcie i napływ jonów Ca^{2+} skutkujący uruchomieniem kaskady reakcji prowadzących do wzrostu, a następnie utrzymania wielkości kolców. Ze względu na fakt, że prawidłowa fosforylacja reszty serynowej 73 powoduje dysocjację PSD-95 od NMDAR, czyli bierze udział we wczesnej fazie przebudowy synapsy, to zaburzenie tej homeostazy poprzez wprowadzenie do komórki niefosforylowalnej wersji PSD95_S73A może upośledzać ten etap przebudowy kolca, co potwierdzają wyniki uzyskane na **Rycinie 12**. PSD95_S73A nie pozwala na przebudowę synapsy, czego może wymagać pierwsza faza uczenia. Z kolei zmienione zachowanie zwierząt w nieco późniejszym momencie treningu, wynikające z obniżonego poziomu PSD-95 w komórce (shRNA-PSD95), może odzwierciedlać zaburzenie późniejszego etapu przebudowy rusztowania, kiedy

do utrzymania informacji wymagane jest zachowanie stabilności kolca dendrytycznego przez obecność funkcjonalnego PSD-95.

5.2. Interakcje społeczne i zachowanie innych zwierząt w populacji wpływają na wybór przestrzenny starzejących się osobników

Zarówno ludzie, jak i gryzonie, w podeszłym wieku charakteryzują się zaburzeniami zachowania w zadaniach zależnych od hipokampa, takich jak odnajdywanie nagrody w labiryncie promienistym lub labiryncie Barnes (Ammassari-Teule i in., 1994; Bach i in., 1999). Jednakże, stare myszy mogą wykorzystywać alternatywne, nieprzestrzenne strategie behawioralne do rozwiązywania zadań wymagających zaangażowania hipokampa i pamięci przestrzennej. Przykładowo, młode myszy stosują strategię przestrzenną w labiryncie Barnes, podczas gdy stare zwierzęta mają tendencję do stosowania nieprzestrzennej strategii wyszukiwania szeregowego, polegającej na systematycznym przeszukiwaniu kolejnych otworów w kierunku zgodnym lub przeciwnym do ruchu wskazówek zegara (Bach i in., 1999). Podobnie w moim doświadczeniu, stare myszy stosowały alternatywną strategię behawioralną w celu identyfikacji narożnika ze słodką wodą w klatce IntelliCage. Zwierzęta opierały się na obserwacjach społecznych (o czym świadczyła duża ilość wizyt bliskich, czyli bezpośrednio po innej myszy) oraz zachowaniach perseweracyjnych, czyli zwyczajowym odwiedzaniu i piciu tylko z jednego, preferowanego rogu, nawet w trakcie adaptacji. Rolę interakcji społecznych w kierowaniu zachowaniem myszy, potwierdził także eksperyment w którym wymieszałam myszy stare i młode. W tym doświadczeniu zachowanie myszy w podeszłym wieku zaczęło przypominać zachowanie myszy młodych i *vice versa*: starsze osobniki w wyniku obserwacji młodych zwierząt zaczęły częściej odwiedzać nienagradzany róg oraz spadła częstość zachowań perseweracyjnych, a myszy młode zaczęły częściej podążać za współlokatorami. Strategie związane z podwyższoną częstością zachowań perseweracyjnych są typowe także dla ludzi w podeszłym wieku (Ridderinkhof i in., 2002). Literatura potwierdza, że interakcje społeczne poprawiają uczenie się lokalizacji u starych myszy z mutacją białka APP (białko prekursora amyloidu komórki) żyjących w grupie (Kiryk i in., 2011). Przedstawione przeze mnie dane pokazują po raz pierwszy, że zdrowe myszy, zarówno stare, jak i młode, wykorzystują informacje społeczne podczas treningu wyboru przestrzennego.

Zachowanie myszy zależy zatem od kontekstu społecznego i, jak na przedstawionym przykładzie wykazano, zmienia się ono w towarzystwie osobników, które stosują alternatywną strategię ze względu na wiek lub upośledzenie funkcji dCA1. Co ciekawe, zachowania perseweracyjne obserwuje się nie tylko u starych osobników, ale zjawisko to jest również charakterystyczne dla zwierząt z lezją lub mutacjami specyficznymi dla hipokampa (Brookes i in., 1983; Hoeffler i in., 2008). Wniosek ten został potwierdzony także w moich doświadczeniach wykorzystujących zmutowaną formę białka PSD-95_S73A. Obecność niefosforylowanego wariantu PSD-95 skutkowałą podwyższoną częstością zachowań perseweracyjnych u młodych osobników. Obserwacje te sugerują, że zwierzęta z upośledzonym działaniem hipokampa mają tendencję do wybierania strategii behawioralnych opierających się na innych obszarach mózgu, np. prążkowi (Brookes i in., 1983; Hoeffler i in., 2008). Potwierdzają tę hipotezę obserwacje wykazujące, że miejscowe obniżenie ilości białka PSD-95 w regionie CA1 starych myszy nie miało wpływu na wybór preferencji miejsca. Sugeruje to, że starsze zwierzęta stosują strategię niezależną od dCA1 podczas dokonywania wyboru przestrzennego. Istnieje jednak możliwość, że wybór przestrzenny u starych myszy angażuje dCA1, ale nie wymaga plastyczności synaptycznej zależnej od PSD-95.

Co ciekawe, lokalna manipulacja obniżająca poziom ekspresji białka PSD-95 w dCA1 powstrzymała zarówno wzrost aktywności myszy w czasie treningu, jak i obniżenie częstotliwości wizyt patrolujących. Efekt ten był widoczny zarówno u młodych, jak i starych osobników. Zachowania te mogą być regulowane przez projekcje z dCA1 do jądra półleżącego (NAc), które są połączeniem pomiędzy układem limbicznym a motorycznym. Jak niedawno wykazano, NAc integruje informacje z dCA1 o środowisku w którym znajduje się nagroda. Projekcje te mogą być wykorzystane do kierowania zachowaniami apetytywnymi i pobudzeniem związanym z otrzymaniem lub przewidywaniem nagrody (Trouche i in., 2019). Tak więc niektóre funkcje dCA1, które wymagają obecności PSD-95, wydają się być zachowane u starych myszy. Upośledzenie wydaje się być specyficzne dla wyborów przestrzennych.

5.3. Zmiany synaptyczne w dCA1 u młodych i starych myszy

Powstawanie pamięci zależnej od hipokampa charakteryzuje się, na poziomie strukturalnym, wzrostem istniejących i powstawaniem nowych kolców dendrytycznych (zawierających synapsy glutaminianergiczne) (Aziz i in., 2019; Mahmmoud i in., 2015; Radwanska i in., 2011; Restivo i in., 2009), długotrwałym wzrostem średniej wielkości PSD (Śliwińska i in., 2020) oraz wbudowywaniem receptorów AMPA w już istniejące synapsy (Matsuo i in., 2008). Pojawia się jednocześnie coraz więcej doniesień pokazujących, że tworzenie pamięci może również angażować lokalne osłabienie transmisji synaptycznej (Connor i Wang, 2016; Kemp i Manahan-Vaughan, 2007), którą charakteryzuje kurczenie się i eliminacja kolców dendrytycznych oraz PSD (Nägerl i in., 2004; Zhou i in., 2004). Chociaż strukturalne korelaty LTD indukowanego uczeniem się były rzadko dokumentowane *in vivo*, zauważono, że wybór przestrzenny w labiryncie Barnes indukuje LTD w obszarze CA1 oraz zmiany zapobiegające LTD, obniżając precyzję wyborów przestrzennych (Goh i Manahan-Vaughan, 2013; Griffiths i in., 2008; Kemp i Manahan-Vaughan, 2004).

Przedstawione przeze mnie dane pokazały, że trening wyboru przestrzennego u młodych myszy powodował kurczenie się kolców dendrytycznych w warstwie promienistej (StRad) pola dCA1. Co więcej, zmniejszeniu uległa także wielkość klastrów PSD-95 w kolcach, co wskazuje na ogólnie zmniejszony poziom tego białka. Podobny kierunek zmian synaptycznych zaobserwowano po awersyjnym treningu przestrzennym, podczas gdy nieprzestrzenny trening apetytywny powodował zwiększenie się kolców dendrytycznych i klastrów PSD-95. Ze względu na fakt, że białko PSD-95 kontroluje lokalizację receptorów AMPA w synapsie (Bats i in., 2007; Opazo i in., 2012) oraz prądy AMPAR (Beique i in., 2006; Opazo i in., 2012; Schlüter i in., 2006), zmiany morfologiczne i molekularne, które zaobserwowałam u zwierząt po treningu przestrzennym, wskazują na osłabienie synaps w rejonie CA1. Wciąż pozostaje do ustalenia, czy trening wyboru przestrzennego w warunkach zbliżonych do naturalnych, indukuje LTD w dCA1, podobnie jak wybór przestrzenny w labiryncie Barnes (Goh i Manahan-Vaughan, 2013; Griffiths i in., 2008; Kemp i Manahan-Vaughan, 2007). Dowodem naukowym popierającym to założenie jest fakt, iż shPSD95, które upośledza wybór przestrzenny młodych myszy w moich doświadczeniach, także obniża poziom białka PSD-95, zapobiega dojrzewaniu kolców

dendrytycznych oraz upośledza LTD (Ehrlich i in., 2007; Xu i in., 2008). Kurczenie się synaps w dCA1 i osłabienie połączeń synaptycznych w czasie dokonywania wyboru przestrzennego może potwierdzać rolę hipokampa w hamowaniu reakcji błędnych wyborów (Bannerman i in., 2012, 2014), czyli na przykład odruchowego wyboru najbliższego rogu, a nie tego z nagrodą. Wciąż jednak nie w pełni rozumiemy w jaki sposób kurczenie się synaps umożliwia dokonywanie poprawnych wyborów przestrzennych, czyli rogu z nagrodą.

Zmiany zachodzące w kolcach dendrytycznych na skutek przebytego treningu wspierają również hipotezę alternatywnego mechanizmu neuronalnego wykorzystywanego przez stare myszy w procesie podejmowania wyboru przestrzennego. U starzejących się zwierząt trening wyboru przestrzennego zwiększył gęstość i rozmiar kolców dendrytycznych, podczas gdy ilość PSD-95 w pojedynczym kolcu uległa obniżeniu. Zatem wzór zmian synaptycznych nie przypominał osłabienia synaptycznego obserwowanego podczas treningu wyboru przestrzennego u młodych osobników. Zaobserwowałam natomiast, cechy nieprzestrzennego treningu apetytywnego (zwiększona gęstość kolców dendrytycznych i ich wzrost), a także treningu przestrzennego (obniżony poziom PSD-95). Ponadto zauważyłam, że kolce dendrytyczne starzejących się osobników są mniejsze, występuje u nich mniej kolców zawierających PSD-95, a samo PSD-95 zajmuje mniejszą powierzchnię w kolcu. U starych myszy zaobserwowano również dekorelację ilości PSD-95 z rozmiarem kolca dendrytycznego w porównaniu do osobników młodych. Obserwowane kurczenie się kolców i obniżony poziom białek synaptycznych jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami na temat zmian zachodzących u starych zwierząt (Counts i in., 2014; Ganeshina i in., 2004; Rogers i in., 2017; Śliwińska i in., 2020). Ze względu na fakt, że małe kolce dendrytyczne z niskim poziomem białka PSD-95 są mniej stabilne niż duże kolce (Cane i in., 2014), przedstawione dane wspierają hipotezę, że kolce dendrytyczne w polu dCA1 starych osobników są mniej stabilne (Mostany i in., 2013). Co istotne, zebrane wyniki po raz pierwszy przedstawiają dekorelację ilości PSD-95 i rozmiaru kolców dendrytycznych u starzejących się myszy. Wydaje się, że zjawisko to jest specyficzne dla starzejącego się mózgu, ponieważ na korelację między tymi dwoma parametrami nie miał wpływu trening wyboru przestrzennego ani nieprzestrzenny trening nagrody u młodych myszy. Dotychczas obserwowano korelację wielkości PSD i objętości kolca po

stymulacji glutaminianem w hodowli komórkowej. Było to jednak zjawisko tymczasowe (<7 min.) i prawdopodobnie spowodowane wolniejszym wzrostem PSD w porównaniu do wzrostu kolca (Bosch i in., 2014; Meyer i in., 2014). Ponadto praca z naszego laboratorium pokazała, że LTP zależne od receptorów NMDA w skrawkach z hodowli organotypowej hipokampa, zwiększało korelację między wielkością PSD a objętością kolca dendrytycznego (Borczyk i in., 2019).

Nadal pozostają nieznane przyczyny i konsekwencje korelacji objętości kolca, PSD i ekspresji PSD-95. Jednak ponieważ PSD-95 kotwaczy receptory AMPA i NMDA (Chen i in., 2015; Sheng i Kim, 2011), poziom PSD-95 może wpływać na sygnalizację wapniową. Modele matematyczne przewidują, że zarówno napływ jonów Ca^{2+} oraz wielkość kolca dendrytycznego mają wpływ na długoterminową stabilność synaps, ich siłę oraz rozkład wielkości kolców (O'Donnel i in., 2011). W związku z tym, wszystkie opisane procesy mogą ulegać zmianie wraz z wiekiem, co prawdopodobnie skutkuje niską specyficznością i stabilnością map kognitywnych w dCA1 starych zwierząt (Attardo i in., 2018; Barnes i in., 1997), a w efekcie prowadzi do zmiany strategii wykorzystywanej podczas treningu na tą niezależną od PSD-95 i dCA1.

Na potwierdzenie tej tezy wskazuje również fakt, iż zaburzona przebudowa rusztowania PSD-95 w synapsach CA1 młodych zwierząt skutkuje pojawieniem się zachowań obserwowanych u starych osobników, jak na przykład perseweracja. Nadprodukcja białka PSD-95 w komórce wpływa na plastyczność synaptyczną, blokuje LTP i wzmacnia LTD (Stein i in., 2003). Dla oddzielenia efektu behawioralnego obserwowanego jedynie w wyniku nadekspresji natywnego białka od specyficznych różnic wywołanych wprowadzoną mutacją, użyto dwóch różnych kontroli dla wariantu PSD95_S73A. W zebranych wynikach nie zaobserwowano zmian zachowania ani odmiennej strategii uczenia się przestrzennego młodych myszy z nadprodukcją natywnej formy białka PSD-95, PSD95_WT, w porównaniu do zwierząt kontrolnych z mCherry. Odmiernym zachowaniem charakteryzowały się jednak zwierzęta ze zmutowaną formą PSD-95_S73A. Myszy te wykazały niewielką zmianę preferencji rogu z nagrodą na początkowym etapie treningu w porównaniu z grupą PSD-95_WT, a ponadto wykazały dużą zmianę preferencji sacharozy.

PSD-95 tworzy kompleks z receptorem NMDA, zaś fosforylacja S73 promuje rozpad tego kompleksu i dyfuzję PSD-95 z PSD. Upośledzenie tego procesu prowadzi do upośledzenia przebudowy kolca dendrytycznego wywołanego stymulacją

receptorów NMDA (Gardoni i in., 2006). Steiner i współpracownicy wykazali, że fosforylacja S73 PSD-95 jest konieczna do zakończenia wzrostu kolca dendrytycznego (Steiner i in., 2008). Obniżenie poziomu synaptycznego białka PSD-95 ma miejsce zarówno wtedy, gdy synapsy są wzmacniane, jak i kiedy są osłabione (Bosch i in., 2014; Colledge i in., 2003; Meyer i in., 2014; Xu i in., 2008). Zatem niezależnie od rodzaju plastyczności, zmniejszona mobilność PSD-95 może ją prawdopodobnie upośledzić. Nie jest jednak jasne, czy tak właśnie dzieje się w przypadku plastyczności indukowanej treningiem. By odpowiedzieć na to pytanie konieczne są kolejne badania. Mutacja PSD-95_S73A w dCA1 spowodowała również pojawienie się perseweracyjnego typu zachowań oraz ograniczyła spontaniczne eksplorowanie klatki. Zachowania tego rodzaju skłaniają do porównania ich ze strategią zachowania starych myszy i sugerują, iż prawidłowa przebudowa PSD w dCA1 jest kluczowa nie tylko dla prawidłowego podejmowania decyzji przestrzennych, ale także dla natywnych, prostych zachowań, takich jak swobodna eksploracja przestrzeni.

6. Podsumowanie i wnioski

Przedstawione dane pokazują, że wybór przestrzenny młodych zwierząt jest regulowany przez procesy zależne od PSD-95 i fosforylacji seryny 73 PSD-95 w dCA1. PSD-95 w dCA1 nie jest jednak zaangażowane w kodowanie pamięci nagrody. W celu otrzymania nagrody w złożonym środowisku, stare myszy wykorzystują alternatywną strategię behawioralną, która polega na obserwacji innych zwierząt w klatce i perseweracyjnych wizytach do preferowanych rogów klatki. Strategia ta jest niezależna od białka PSD-95 w dCA1.

7. Bibliografia

1. Adams, M.M., Morrison, J.H., Gore, A.C., 2001. N-Methyl-d-Aspartate Receptor mRNA Levels Change during Reproductive Senescence in the Hippocampus of Female Rats. *Exp. Neurol.* 170, 171–179. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7687>
2. Aggleton, J.P., Blindt, H.S., Candy, J.M., 1989. Working Memory in Aged Rats. *Behav. Neurosci.* 103, 975–983.
3. Alcantara-Gonzalez, F., Juarez, I., Solis, O., Martinez-Tellez, I., Camacho-Abrego, I., Masliah, E., Mena, R., Flores, G., 2010. Enhanced dendritic spine number of neurons of the prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in old rats after chronic donepezil administration. *Synapse* 64, 786–793. <https://doi.org/10.1002/syn.20787>
4. Al-Hallaq, R.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Wenthold, R.J., 2007. NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 8334–8343. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007>
5. Allen, T.A., Salz, D.M., McKenzie, S., Fortin, N.J., 2016. Nonspatial sequence coding in CA1 neurons. *J. Neurosci.* 36, 1547–1563. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2874-15.2016>
6. Ammassari-Teule, M., Fagioli, S., Rossi-Arnaud, C., 1994. Radial maze performance and open-field behaviours in aged C57BL/6 mice: Further evidence for preserved cognitive abilities during senescence. *Physiol. Behav.* 55, 341–345. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90144-9)
7. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J., 2007. *The Hippocampus Book*, Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.003.0014>
8. Aoki, C., Miko, I., Oviedo, H., Mikeladze-Dvali, T., Alexandre, L., Sweeney, N., Bredt, D.S., 2001. Electron microscopic immunocytochemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neonatal rat visual cortex. *Synapse* 40, 239–257. <https://doi.org/10.1002/syn.1047>
9. Arellano, J.I., 2007. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front. Neurosci.* 1, 131–143. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.010.2007>
10. Attardo, A., Fitzgerald, J.E., Schnitzer, M.J., 2015. Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus. *Nature* 523, 592–596. <https://doi.org/10.1038/nature14467>
11. Attardo, A., Lu, J., Kawashima, T., Okuno, H., Fitzgerald, J.E., Bito, H., Schnitzer, M.J., 2018. Long-Term Consolidation of Ensemble Neural Plasticity Patterns in Hippocampal Area CA1 Article Long-Term Consolidation of Ensemble Neural Plasticity Patterns in Hippocampal Area CA1. *Cell Rep.* 25, 640–650. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.064>
12. Aziz, W., Kraev, I., Mizuno, K., Kirby, A., Fang, T., Rupawala, H., Kasbi, K., Rothe, S., Jozsa, F., Rosenblum, K., Stewart, M.G., Giese, K.P., 2019. Multi-input Synapses, but Not LTP-Strengthened Synapses, Correlate with Hippocampal Memory

Storage in Aged Mice. *Curr. Biol.* 29, 3600-3610.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.064>

13. Bach, E.M., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., by Eric Kandel, C.R., 1999. Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Neurobiology* 96, 5280–5285.
14. Baddeley, A., 2012. Working Memory: Theories, Models, and Controversies. *Annu. Rev. Psychol.* 63, 1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-120710-100422>
15. Baddeley, A., 2000. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn. Sci.* 4, 417–423. [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(00\)01538-2](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(00)01538-2)
16. Baddeley, A., 1998. Recent developments in working memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 234–238. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(98\)80145-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80145-1)
17. Baddeley, A., 1992. Working Memory 255, 556–559. <https://doi.org/10.1126/science.1736359>
18. Baddeley, A., Hitch, G., 1974. Working Memory, in: *Psychology of Learning and Motivation*, Ed. G. H. Bower. New York, NY: Academic Press, pp. 47–89.
19. Baker, D.J., Petersen, R.C., 2018. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J. Clin. Invest.* 128, 1208–1216. <https://doi.org/10.1172/JCI95145>
20. Bannerman, D.M., Bus, T., Taylor, A., Sanderson, D.J., Schwarz, I., Jensen, V., Hvalby, Ø., Rawlins, J.N.P., Seeburg, P.H., Sprengel, R., 2012. Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nat. Neurosci.* 15, 1153–1159. <https://doi.org/10.1038/nn.3166>
21. Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., Mchugh, S.B., Rawlins, J.N.P., Monyer, H., Seeburg, P.H., 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 181–192. <https://doi.org/10.1038/nrn3677>
22. Barnes, C.A., 1979. Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 74–104.
23. Barnes, C.A., Markowska, A.L., Ingram, D.K., Kametani, H., Spangler, E.L., Lemken, V.J., Olton, D.S., 1990. Acetyl-l-Carnitine 2: Effects on Learning and Memory Performance of Aged Rats in Simple and Complex Mazes. *Neurobiol. Aging* 11, 499–506. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90110-L](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90110-L)
24. Barnes, C.A., McNaughton, B.L., 1986. An Age Comparison of the Rates of Acquisition and Forgetting of Spatial Information in Relation to Long-Term Enhancement of Hippocampal Synapses. *Behav. Neurosci.* 99, 1040–1048. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.99.6.1040>
25. Barnes, C.A., Nadel, L., Honig, W.K., 1980. Spatial memory deficit in senescent rats. *Can. J. Psychol.* 34, 29–39. <https://doi.org/10.1037/h0081022>

26. Barnes, C.A., Rao, G., Foster, T.C., McNaughton, B.L., 1992. Region-specific age effects on AMPA sensitivity: Electrophysiological evidence for loss of synaptic contacts in hippocampal field CA1. *Hippocampus* 2, 457–468. <https://doi.org/10.1002/hipo.450020413>
27. Barnes, C.A., Rao, G., Orr, G., 2000. Age-Related Decrease in the Schaffer Collateral-Evoked EPSP in Awake, Freely, Behaving Rats. *Neural Plast.* 7, 167–178. <https://doi.org/10.1155/NP.2000.167>
28. Barnes, C.A., Suster, M.S., Shen, J., McNaughton, B.L., 1997. Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature* 388, 272–275. <https://doi.org/10.1038/40859>
29. Barrett, G.L., Bennie, A., Trieu, J., Ping, S., Tsafoulis, C., 2009. The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the Barnes maze. *Behav. Neurosci.* 123, 533–538. <https://doi.org/10.1037/a0015063>
30. Bats, C., Groc, L., Choquet, D., 2007. The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron* 53, 719–734. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.030>
31. Beique, J.-C., Lin, D.-T., Kang, M.-G., Aizawa, H., Takamiya, K., Huganir, R.L., 2006. Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 19535–19540. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608492103>
32. Berry, K.P., Nedivi, E., 2017. Spine Dynamics: Are They All the Same?, *Neuron. Cell Press.* <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
33. Bianchetta, M.J., Lam, T.T., Jones, S.N., Morabito, M.A., 2011. Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulates PSD-95 Ubiquitination in Neurons. *J. Neurosci.* 31, 12029–12035. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2388-11.2011>
34. Billard, J.M., Rouaud, E., 2007. Deficit of NMDA receptor activation in CA1 hippocampal area of aged rats is rescued by D-cycloserine. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2260–2268. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05488.x>
35. Bimonte, H.A., Nelson, M.E., Granholm, A.-C.E., 2003. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol. Aging* 24, 37–48. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00015-5)
36. Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
37. Bliss, T.V.P., Lømo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
38. Bodhinathan, K., Kumar, A., Foster, T.C., 2010. Intracellular Redox State Alters NMDA Receptor Response during Aging through Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *J. Neurosci.* 30, 1914–1924. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5485-09.2010>
39. Borczyk, M., Śliwińska, M.A., Caly, A., Bernas, T., Radwanska, K., 2019. Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its

postsynaptic density. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38412-7>

40. Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., Hayashi, Y., 2014. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* 82, 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
41. Bosch, M., Hayashi, Y., 2012. Structural plasticity of dendritic spines, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002>
42. Bourne, J., Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember ? 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
43. Brim, B.L., Haskell, R., Awedikian, R., Ellinwood, N.M., Jin, L., Kumar, A., Foster, T.C., Magnusson, K.R., 2013. Memory in aged mice is rescued by enhanced expression of the GluN2B subunit of the NMDA receptor. *Behav. Brain Res.* 238, 211–226. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.026>
44. Brookes, S., Rawlins, J.N.P., Gray, J.A., 1983. Hippocampal lesions do not alter the partial punishment effect. *Exp. Brain Res.* 52, 34–40. <https://doi.org/10.1007/BF00237146>
45. Camp, M.C., Feyder, M., Ihne, J., Palachick, B., Hurd, B., Karlsson, R.M., Noronha, B., Chen, Y.C., Coba, M.P., Grant, S.G.N., Holmes, A., 2011. A novel role for PSD-95 in mediating ethanol intoxication, drinking and place preference. *Addict. Biol.* <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00282.x>
46. Cane, M., Maco, B., Knott, G., Holtmaat, A., 2014. The relationship between PSD-95 clustering and spine stability In Vivo. *J. Neurosci.* 34, 2075–2086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3353-13.2014>
47. Chen, X., Levy, J.M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Nicoll, R.A., Reese, T.S., 2015. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E6983–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517045112>
48. Chen, X., Nelson, C.D., Li, X., Winters, C.A., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Gainer, H., Sheng, M., Reese, T.S., 2011. PSD-95 Is Required to Sustain the Molecular Organization of the Postsynaptic Density. *J. Neurosci.* 31, 6329–6338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5968-10.2011>
49. Chen, X., Vinade, L., Leapman, R.D., Petersen, J.D., Nakagawa, T., Phillips, T.M., Sheng, M., Reese, T.S., 2005. Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11551–11556. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505359102>
50. Chen, Y., Sabatini, B.L., 2012. Signaling in dendritic spines and spine microdomains, *Current Opinion in Neurobiology*. *Curr Opin Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.003>
51. Cheng, D., Hoogenraad, C.C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M.A., Duong, D.M., Xu, P., Wijayawardana, S.R., Hanfelt, J., Nakagawa, T., Sheng, M., Peng, J., 2006. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1158–1170.

<https://doi.org/10.1074/mcp.D500009-MCP200>

52. Chiba, A.A., Kesner, R.P., Reynolds, A.M., 1994. Memory for spatial location as a function of temporal lag in rats: Role of hippocampus and medial prefrontal cortex. *Behav. Neural Biol.* 61, 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(05\)80065-2](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(05)80065-2)
53. Cho, K.O., Hunt, C.A., Kennedy, M.B., 1992. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929–942. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90245-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90245-9)
54. Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.-F., Haganir, R.L., 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J. Neurosci.* 24, 10248–10259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0546-04.2004>
55. Citri, A., Malenka, R.C., 2008. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms, *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
56. Clayton, D.A., Browning, M.D., 2001. Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. *Neurobiol. Aging* 22, 165–168. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00196-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00196-2)
57. Clayton, D.A., Mesches, M.H., Alvarez, E., Bickford, P.C., Browning, M.D., 2002. A Hippocampal NR2B Deficit Can Mimic Age-Related Changes in Long-Term Potentiation and Spatial Learning in the Fischer 344 Rat. *J. Neurosci.* 22, 3628–3637. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03628.2002>
58. Colledge, M., Snyder, E.M., Crozier, R.A., Soderling, J.A., Jin, Y., Langeberg, L.K., Lu, H., Bear, M.F., Scott, J.D., 2003. Ubiquitination Regulates PSD-95 Degradation and AMPA Receptor Surface Expression. *Nuron* 40, 595–607.
59. Connor, S.A., Wang, Y.T., 2016. A Place at the Table: LTD as a Mediator of Memory Genesis. *Neuroscientist* 22, 359–371. <https://doi.org/10.1177/1073858415588498>
60. Coultrap, S.J., Bickford, P.C., Browning, M.D., 2008. Blueberry-enriched diet ameliorates age-related declines in NMDA receptor-dependent LTP. *AGE* 30, 263–272. <https://doi.org/10.1007/s11357-008-9067-y>
61. Counts, S.E., Alldred, M.J., Che, S., Ginsberg, S.D., Mufson, E.J., 2014. Synaptic gene dysregulation within hippocampal CA1 pyramidal neurons in mild cognitive impairment. *Neuropharmacology* 79, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.10.018>
62. Crook, T., Bartus, R.T., Ferris, S.H., Whitehouse, P., Cohen, G.D., Gershon, S., 1986. Age-associated memory impairment: Proposed diagnostic criteria and measures of clinical change — report of a national institute of mental health work group. *Dev. Neuropsychol.* 2, 261–276. <https://doi.org/10.1080/87565648609540348>
63. Day, M., Langston, R., Morris, R.G.M., 2003. Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. *Nature* 424, 205–209. <https://doi.org/10.1038/nature01769>
64. Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P., 2006. T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 1, 7–12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>

65. Dickstein, D.L., Weaver, C.M., Luebke, J.I., Hof, P.R., 2013. Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience, Dendritic Spine Plasticity in Brain Disorders* 251, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.077>
66. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61.
67. Dosemeci, A., Weinberg, R.J., Reese, T.S., Tao-Cheng, J.H., 2016. The postsynaptic density: There is more than meets the eye. *Front. Synaptic Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00023>
68. Driscoll, I., Davatzikos, C., An, Y., Wu, X., Shen, D., Kraut, M., Resnick, S.M., 2009. Longitudinal pattern of regional brain volume change differentiates normal aging from MCI. *Neurology* 72, 1906–1913. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181a82634>
69. Driscoll, I., Hamilton, D.A., Petropoulos, H., Yeo, R.A., Brooks, W.M., Baumgartner, R.N., Sutherland, R.J., 2003. The Aging Hippocampus: Cognitive, Biochemical and Structural Findings. *Cereb. Cortex* 13, 1344–1351. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhg081>
70. Driscoll, I., Howard, S.R., Stone, J.C., Monfils, M.H., Tomanek, B., Brooks, W.M., Sutherland, R.J., 2006. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139, 1173–1185. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.040>
71. Dumas, T.C., 2005. Developmental regulation of cognitive abilities: Modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog. Neurobiol.* 76, 189–211. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.08.002>
72. Dzik, J.M., 2018. Metody analizy zachowania myszy w systemie IntelliCage (Methods of analysis of mouse behaviour in the IntelliCage system). PhD Thesis. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.32854.50243/2>
73. Dzik, J.M., Puścian, A., Mijkowska, Z., Radwanska, K., Leski, S., 2018. PyMICE: A Python library for analysis of IntelliCage data. *Behav. Res. Methods* 50, 804–815. <https://doi.org/10.3758/s13428-017-0907-5>
74. Eckles-Smith, K., Clayton, D., Bickford, P., Browning, M.D., 2000. Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Mol. Brain Res.* 78, 154–162. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00088-7)
75. Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., Malinow, R., 2007. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4176–4181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609307104>
76. Ehrlich, I., Malinow, R., 2004. Postsynaptic Density 95 controls AMPA Receptor Incorporation during Long-Term Potentiation and Experience-Driven Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 24, 916–927. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4733-03.2004>
77. Eichenbaum, H., Cohen, N.J., 2001. From conditioning to conscious recollection, Oxford University Press, New York.
78. Eichenbaum, H., Kuperstein, M., Fagan, A., Nagode, J., 1987. Cue-sampling and goal-approach correlates of hippocampal unit activity in rats performing an

- odor-discrimination task. *J. Neurosci.* 7, 716–732. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.07-03-00716.1987>
79. Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., Lipton, P., 2012. Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.006>
 80. El-Husseini, A.E.D., Brecht, D.S., 2002. Protein palmitoylation: A regulator of neuronal development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 791–802. <https://doi.org/10.1038/nrn940>
 81. El-Husseini, A.E.-D., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., Brecht, D.S., 2000. PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. *Science* 290, 1364–1368. <https://doi.org/10.1126/science.290.5495.1364>
 82. El-Husseini, A.E.D., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Aguilera-Moreno, A., Nicoll, R.A., Brecht, D.S., 2002. Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108, 849–863. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00683-9)
 83. Elkobi, A., Ehrlich, I., Belevovsky, K., Barki-Harrington, L., Rosenblum, K., 2008. ERK-dependent PSD-95 induction in the gustatory cortex is necessary for taste learning, but not retrieval. *Nat. Neurosci.* 11, 1149–1151. <https://doi.org/10.1038/nn.2190>
 84. Fanselow, M.S., Dong, H.-W., 2010. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65, 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
 85. Fanselow, M.S., Poulos, A.M., 2005. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu. Rev. Psychol.* 56, 207–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070213>
 86. Fedulov, V., Rex, C.S., Simmons, D.A., Palmer, L., Gall, C.M., Lynch, G., 2007. Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *J. Neurosci.* 27, 8031–8039. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2003-07.2007>
 87. Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., Sanes, J.R., 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00084-2)
 88. Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0)
 89. Feyder, M., Karlsson, R.-M., Mathur, P., Lyman, M., Bock, R., Momenan, R., Munasinghe, J., Scattoni, M.L., Ihne, J., Camp, M., Graybeal, C., Strathdee, D., Begg, A., Alvarez, V.A., Kirsch, P., Rietschel, M., Cichon, S., Walter, H., Meyer-Lindenberg, A., Grant, S.G.N., Holmes, A., 2010. Association of Mouse Dlg4 (PSD-95) Gene Deletion and Human DLG4 Gene Variation With Phenotypes Relevant to Autism Spectrum Disorders and Williams' Syndrome. *Am. J. Psychiatry* 167,

1508–1517. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10040484>

90. Feyissa, A.M., Chandran, A., Stockmeier, C.A., Karolewicz, B., 2009. Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.10.005>
91. Fiala, J.C., 2005. Reconstruct: A free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* 218, 52–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01466.x>
92. Fitzgerald, P.J., Pinard, C.R., Camp, M.C., Feyder, M., Sah, A., Bergstrom, H.C., Graybeal, C., Liu, Y., Schlüter, O.M., Grant, S.G., Singewald, N., Xu, W., Holmes, A., 2015. Durable fear memories require PSD-95. *Mol. Psychiatry* 20, 901–912. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.161>
93. Flood, D.G., 1993. Critical issues in the analysis of dendritic extent in aging humans, primates, and rodents. *Neurobiol. Aging* 14, 649–654. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90058-J](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90058-J)
94. Fortin, N.J., Agster, K.L., Eichenbaum, H.B., 2002. Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat. Neurosci.* 5, 458–462. <https://doi.org/10.1038/nn834>
95. Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., Monti, D., Capri, M., Salvioli, S., 2018. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front. Med.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00061>
96. Freeman, S.H., Kandel, R., Cruz, L., Rozkalne, A., Newell, K., Frosch, M.P., Hedley-Whyte, E.T., Locascio, J.J., Lipsitz, L.A., Hyman, B.T., 2008. Preservation of Neuronal Number Despite Age-Related Cortical Brain Atrophy in Elderly Subjects Without Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1205–1212. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818fc72f>
97. Fukata, Y., Dimitrov, A., Boncompain, G., Vielemeyer, O., Perez, F., Fukata, M., 2013. Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J. Cell Biol.* 202, 145–161. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302071>
98. Fukata, Y., Fukata, M., 2010. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 161–175. <https://doi.org/10.1038/nrn2788>
99. Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., Inokuchi, K., 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38, 447–460. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00206-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00206-X)
100. Gallagher, M., Burwell, R., Burchinal, M., 1993. Severity of Spatial Learning Impairment in Aging: Development of a Learning Index for Performance in the Morris Water Maze. *Behav. Neurosci.* 107, 618–26.
101. Ganeshina, O., Berry, R.W., Petralia, R.S., Nicholson, D.A., Geinisman, Y., 2004. Differences in the Expression of AMPA and NMDA Receptors between Axospinous Perforated and Nonperforated Synapses Are Related to the Configuration and Size of Postsynaptic Densities. *J. Comp. Neurol.* 468, 86–95. <https://doi.org/10.1002/cne.10950>

102. Gardoni, F., Polli, F., Cattabeni, F., Di Luca, M., 2006. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2694–2704. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05140.x>
103. Geneva: The World Health Organization, 2008. The world health report: primary health care - now more than ever. <https://doi.org/10.12927/hcpol.2013.22778>
104. Giese, K.P., Aziz, W., Kraev, I., Stewart, M.G., 2015. Generation of multi-innervated dendritic spines as a novel mechanism of long-term memory formation, *Neurobiology of Learning and Memory*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.04.009>
105. Goh, J.J., Manahan-Vaughan, D., 2013. Spatial object recognition enables endogenous LTD that curtails LTP in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex* 23, 1118–1125. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs089>
106. Gray, E.G., 1959. Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex. *Nature* 183, 1592–1593.
107. Graziane, N.M., Sun, S., Wright, W.J., Jang, D., Liu, Z., Huang, Y.H., Nestler, E.J., Wang, Y.T., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2016. Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat. Neurosci.* 19, 915–925. <https://doi.org/10.1038/nn.4313>
108. Griffiths, S., Scott, H., Glover, C., Bienemann, A., Ghorbel, M.T., Uney, J., Brown, M.W., Warburton, E.C., Bashir, Z.I., 2008. Expression of Long-Term Depression Underlies Visual Recognition Memory. *Neuron* 58, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.022>
109. Gruart, A., Muñoz, M.D., Delgado-García, J.M., 2006. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J. Neurosci.* 26, 1077–1087. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006>
110. Grutzendler, J., Kasthuri, N., Gan, W.B., 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812–816. <https://doi.org/10.1038/nature01276>
111. Hanks, S.D., Flood, D.G., 1991. Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. I. CA1 of hippocampus. *Brain Res.* 540, 63–82. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90493-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90493-F)
112. Harada, C.N., Natelson Love, M.C., Triebel, K., 2013. Normal Cognitive Aging. *Clin. Geriatr. Med.* 29, 737–752. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.002>
113. Harda, Z., Dzik, J.M., Nalberczak-Skóra, M., Meyza, K., Lukasiewicz, K., Leski, S., Radwanska, K., 2018. Autophosphorylation of α CaMKII affects social interactions in mice. *Genes Brain Behav.* 1–8. <https://doi.org/10.1111/gbb.12457>
114. Harris, K.M., Jensen, F.E., Tsao, B., 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: Implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation (*J Neurosci* (July 1992) 12 (2685-2705)). *J. Neurosci.* 12.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-07-02685.1992>

115. Harris, K.M., Stevens, J.K., 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 2982–2997.
116. Hebb, D.O., 1949. *The organization of behavior. A neuropsychological theory*, New York: John Wiley & Sons.
117. Hedden, T., Gabrieli, J.D.E., 2004. Insights into the ageing mind: A view from cognitive neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 87–96. <https://doi.org/10.1038/nrn1323>
118. Henley, J.M., Wilkinson, K.A., 2016. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 337–350. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.37>
119. Hershko, A., Heller, H., Elias, S., Ciechanover, A., 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258, 8206–8214. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)82050-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)82050-x)
120. Ho, G.P.H., Selvakumar, B., Mukai, J., Hester, L.D., Wang, Y., Gogos, J.A., Snyder, S.H., 2011. S-Nitrosylation and S-Palmitoylation Reciprocally Regulate Synaptic Targeting of PSD-95. *Neuron* 71, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.033>
121. Hoeffler, C.A., Tang, W., Wong, H., Santillan, A., Patterson, R.J., Martinez, L.A., Tejada-Simon, M.V., Paylor, R., Hamilton, S.L., Klann, E., 2008. Removal of FKBP12 Enhances mTOR-Raptor Interactions, LTP, Memory, and Perseverative/Repetitive Behavior. *Neuron* 60, 832–845. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.037>
122. Hok, V., Lenck-Santini, P.P., Roux, S., Save, E., Muller, R.U., Poucet, B., 2007. Goal-related activity in hippocampal place cells. *J. Neurosci.* 27, 472–482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2864-06.2007>
123. Holtmaat, A., Svoboda, K., 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647–658. <https://doi.org/10.1038/nrn2699>
124. Ineichen, B., 2000. The epidemiology of dementia in Africa: a review. *Soc. Sci. Med.* 50, 1673–1677. [https://doi.org/10.1016/S0277-9536\(99\)00392-5](https://doi.org/10.1016/S0277-9536(99)00392-5)
125. Jaffe, H., Vinade, L., Dosemeci, A., 2004. Identification of novel phosphorylation sites on postsynaptic density proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.122>
126. Jones, B.J., Pest, S.M., Vargas, I.M., Glisky, E.L., Fellous, J.M., 2015. Contextual reminders fail to trigger memory reconsolidation in aged rats and aged humans. *Neurobiol. Learn. Mem.* 120, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.02.003>
127. Jung, M.W., McNaughton, B.L., 1993. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* 3, 165–182. <https://doi.org/10.1002/hipo.450030209>
128. Katz, Y., Menon, V., Nicholson, D.A., Geinisman, Y., Kath, W.L., Spruston, N., 2009.

Synapse Distribution Suggests a Two-Stage Model of Dendritic Integration in CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* 63, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.023>

129. Kemp, A., Manahan-Vaughan, D., 2007. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci.* 30, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.01.002>
130. Kemp, A., Manahan-Vaughan, D., 2004. Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8192–8197. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402650101>
131. Kennard, J.A., Woodruff-Pak, D.S., 2011. Age Sensitivity of Behavioral Tests and Brain Substrates of Normal Aging in Mice. *Front. Aging Neurosci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2011.00009>
132. Kerr, D.S., Campbell, L.W., Hao, S.Y., Landfield, P.W., 1989. Corticosteroid modulation of hippocampal potentials: increased effect with aging. *Science* 245, 1505–1509. <https://doi.org/10.1126/science.2781293>
133. Kesner, R., Novak, J., 1982. Serial position curve in rats: role of the dorsal hippocampus. *Science* 218, 173–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1428-6_1816
134. Kesner, R.P., Gilbert, P.E., Barua, L.A., 2002. The role of the hippocampus in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Behav. Neurosci.* 116, 286–290. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.116.2.286>
135. Kessels, H.W., Malinow, R., 2009. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* 61, 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015>
136. Kim, E., Sheng, M., 2004. PDZ domain proteins of synapses, *Nature Reviews Neuroscience*. *Nat Rev Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nrn1517>
137. Kim, M.J., Futai, K., Jo, J., Hayashi, Y., Cho, K., Sheng, M., 2007. Synaptic Accumulation of PSD-95 and Synaptic Function Regulated by Phosphorylation of Serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56, 488–502. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.007>
138. Kiryk, A., Mochol, G., K. Filipkowski, R., Wawrzyniak, M., Lioudyno, V., Knapska, E., Gorkiewicz, T., Balcerzyk, M., Leski, S., Van Leuven, F., Lipp, H.-P., K. Wojcik, D., Kaczmarek, L., 2011. Cognitive Abilities of Alzheimers Disease Transgenic Mice are Modulated by Social Context and Circadian Rhythm. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 883–892. <https://doi.org/10.2174/156720511798192745>
139. Köhr, G., 2006. NMDA receptor function: Subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.* 326, 439–446. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0273-6>
140. Komorowski, R.W., Manns, J.R., Eichenbaum, H., 2009. Robust conjunctive item - Place coding by hippocampal neurons parallels learning what happens where. *J. Neurosci.* 29, 9918–9929. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1378-09.2009>
141. Konorski, J., 1948. Conditioned reflexes and neuron organization. *Camb. Univ. Press.* [https://doi.org/10.1002/1097-4679\(195001\)6:1<107::aid-jclp2270060132>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-4679(195001)6:1<107::aid-jclp2270060132>3.0.co;2-0)

142. Kopec, C.D., 2006. Glutamate Receptor Exocytosis and Spine Enlargement during Chemically Induced Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 26, 2000–2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3918-05.2006>
143. Korobova, F., Svitkina, T.M., 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 21, 165–176. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-07-0596>
144. Kral, V.A., 1962. Senescent Forgetfulness: Benign and Malignant. *Can. Med. Assoc. J.* 86, 257–260.
145. Kral, V.A., 1958. Neuro-psychiatric observations in an old peoples home; studies of memory dysfunction in senescence 13, 169–176.
146. Kumar, A., Foster, T.C., 2013. Linking Redox Regulation of NMDAR Synaptic Function to Cognitive Decline during Aging. *J. Neurosci.* 33, 15710–15715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2176-13.2013>
147. Kumar, A., Rani, A., Scheinert, R.B., Ormerod, B.K., Foster, T.C., 2018. Nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin improves spatial memory and NMDA receptor function in aged animals. *Neurobiol. Aging* 70, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.026>
148. Kwapis, J.L., Alagband, Y., López, A.J., Long, J.M., Li, X., Shu, G., Bodinayake, K.K., Matheos, D.P., Rapp, P.R., Wood, M.A., 2019. HDAC3-mediated repression of the Nr4a family contributes to age-related impairments in long-term memory. *J. Neurosci.* 39, 4999–5009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2799-18.2019>
149. Landfield, P.W., McGaugh, J.L., Lynch, G., 1978. Impaired synaptic potentiation processes in the hippocampus of aged, memory-deficient rats. *Brain Res.* 150, 85–101. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90655-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90655-8)
150. Landfield, P.W., Pitler, T.A., 1984. Prolonged Ca²⁺-dependent afterhyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. *Science* 226, 1089–1092. <https://doi.org/10.1126/science.6494926>
151. Laurie, D.J., Bartke, I., Schoepfer, R., Naujoks, K., Seeburg, P.H., 1997. Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal antibodies. *Mol. Brain Res.* 51, 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00206-4)
152. Laurie, D.J., Seeburg, P.H., 1994. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J. Neurosci.* 14, 3180–3194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-03180.1994>
153. Law, A.J., Weickert, C.S., Webster, M.J., Herman, M.M., Kleinman, J.E., Harrison, P.J., 2003a. Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1197–1205. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02850.x>
154. Law, A.J., Weickert, C.S., Webster, M.J., Herman, M.M., Kleinman, J.E., Harrison, P.J., 2003b. Changes in NMDA Receptor Subunit mRNAs and Cyclophilin mRNA during Development of the Human Hippocampus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003, 426–430. <https://doi.org/10.1196/annals.1300.043>
155. Lee, H.K., Min, S.S., Gallagher, M., Kirkwood, A., 2005. NMDA receptor-

- independent long-term depression correlates with successful aging in rats. *Nat. Neurosci.* 8, 1657–1659. <https://doi.org/10.1038/nn1586>
156. Lee, S.J.R., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E.M., Yasuda, R., 2009. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 458, 299–304. <https://doi.org/10.1038/nature07842>
 157. Lee, W.-H., Kumar, A., Rani, A., Foster, T.C., 2014. Role of antioxidant enzymes in redox regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function and memory in middle-aged rats. *Neurobiol. Aging* 35, 1459–1468. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.002>
 158. Leuba, G., Savioz, A., Vernay, A., Carnal, B., Kraftsik, R., Tardif, E., Riederer, I., Riederer, B.M., 2008a. Differential Changes in Synaptic Proteins in the Alzheimer Frontal Cortex with Marked Increase in PSD-95 Postsynaptic Protein. *J. Alzheimers Dis.* 15, 139–151. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-15112>
 159. Leuba, G., Vernay, A., Kraftsik, R., Tardif, E., Riederer, B.M., Savioz, A., 2014. Pathological reorganization of NMDA receptors subunits and postsynaptic protein PSD-95 distribution in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 11, 86–96. <https://doi.org/10.2174/15672050113106660170>
 160. Leuba, G., Walzer, C., Vernay, A., Carnal, B., Kraftsik, R., Piotton, F., Marin, P., Bouras, C., Savioz, A., 2008b. Postsynaptic density protein PSD-95 expression in Alzheimer's disease and okadaic acid induced neuritic retraction. *Neurobiol. Dis.* 30, 408–419. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.02.012>
 161. Li, B., Otsu, Y., Murphy, T.H., Raymond, L.A., 2003. Developmental Decrease in NMDA Receptor Desensitization Associated with Shift to Synapse and Interaction with Postsynaptic Density-95. *J. Neurosci.* 23, 11244–11254. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-35-11244.2003>
 162. Liu, P., Smith, P.F., Darlington, C.L., 2008. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: Regional variations and effects of aging. *Synapse* 62, 834–841. <https://doi.org/10.1002/syn.20563>
 163. Liu, X.-B., Murray, K.D., Jones, E.G., 2004. Switching of NMDA Receptor 2A and 2B Subunits at Thalamic and Cortical Synapses during Early Postnatal Development. *J. Neurosci.* 24, 8885–8895. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2476-04.2004>
 164. Logie, R.H., Pearson, D.G., 1997. The Inner Eye and the Inner Scribe of Visuo-spatial Working Memory: Evidence from Developmental Fractionation. *Eur. J. Cogn. Psychol.* 9, 241–257. <https://doi.org/10.1080/713752559>
 165. Lu, W., Shi, Y., Jackson, A.C., Bjorgan, K., During, M.J., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Nicoll, R.A., 2009. Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors Revealed by a Single-Cell Genetic Approach. *Neuron* 62, 254–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.027>
 166. Luine, V., Hearn, M., 1990. Spatial memory deficits in aged rats: contributions of the cholinergic system assessed by ChAT. *Brain Res.* 523, 321–324. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91507-D](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91507-D)
 167. Luo, Y., Zhou, J., Li, M.-X., Wu, P.-F., Hu, Z.-L., Ni, L., Jin, Y., Chen, J.-G., Wang, F., 2015. Reversal of aging-related emotional memory deficits by norepinephrine

- via regulating the stability of surface AMPA receptors. *Aging Cell* 14, 170–179. <https://doi.org/10.1111/accel.12282>
168. Lüscher, C., Malenka, R.C., 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
 169. Magnusson, K.R., 2001. Influence of diet restriction on NMDA receptor subunits and learning during aging. *Neurobiol. Aging* 22, 613–627. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00258-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00258-X)
 170. Magnusson, K.R., 2000. Declines in mRNA Expression of Different Subunits May Account for Differential Effects of Aging on Agonist and Antagonist Binding to the NMDA Receptor. *J. Neurosci.* 20, 1666–1674. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-05-01666.2000>
 171. Magnusson, K.R., Kresge, D., Supon, J., 2006. Differential effects of aging on NMDA receptors in the intermediate versus the dorsal hippocampus. *Neurobiol. Aging* 27, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.012>
 172. Magnusson, K.R., Nelson, S.E., Young, A.B., 2002. Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor. *Mol. Brain Res.* 99, 40–45. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00344-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00344-8)
 173. Magnusson, K.R., Scruggs, B., Zhao, X., Hammersmark, R., 2007. Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC Neurosci.* 8, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-43>
 174. Mahmmoud, R.R., Sase, S., Aher, Y.D., Sase, A., Gröger, M., Mokhtar, M., Höger, H., Lubec, G., 2015. Spatial and working memory is linked to spine density and mushroom spines. *PLoS ONE* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139739>
 175. Malenka, R.C., 1994. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78, 535–538. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90517-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90517-7)
 176. Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758>
 177. Manns, J.R., Eichenbaum, H., 2009. A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learn. Mem.* 16, 616–624. <https://doi.org/10.1101/lm.1484509>
 178. Markham, J.A., McKian, K.P., Stroup, T.S., Juraska, J.M., 2005. Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 of hippocampus. *Hippocampus* 15, 97–103. <https://doi.org/10.1002/hipo.20034>
 179. Markowska, A.L., Stone, W.S., Ingram, D.K., Reynolds, J., Gold, P.E., Conti, L.H., Pontecorvo, M.J., Wenk, G.L., Olton, D.S., 1989. Individual differences in aging: Behavioral and neurobiological correlates. *Neurobiol. Aging* 10, 31–43. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(89\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(89)80008-9)
 180. Márquez Loza, A., Elias, V., Wong, C.P., Ho, E., Bermudez, M., Magnusson, K.R., 2017. Effects of ibuprofen on cognition and NMDA receptor subunit expression across aging. *Neuroscience* 344, 276–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.041>

181. Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G.M., 2000. Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis, *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
182. Mathers, C.D., Loncar, D., 2002. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results, Geneva: World Health Organization; 2005 (Evidence and Information for Policy Working Paper).
183. Matsuo, N., Reijmers, L., Mayford, M., 2008. Spine-type-specific recruitment of newly synthesized AMPA receptors with learning. *Science* 319, 1104–7. <https://doi.org/10.1126/science.1149967>
184. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H., 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–6. <https://doi.org/10.1038/nature02617>
185. McQuail, J.A., Nicolle, M.M., 2015. Spatial Reference Memory in Normal Aging Fischer 344 × Brown Norway F1 Hybrid Rats. *Neurobiol. Aging* 36, 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.030>
186. Ménard, C., Quirion, R., 2012. Successful Cognitive Aging in Rats: A Role for mGluR5 Glutamate Receptors, Homer 1 Proteins and Downstream Signaling Pathways. *PLOS ONE* 7, e28666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028666>
187. Mesches, M.H., Gemma, C., Veng, L.M., Allgeier, C., Young, D.A., Browning, M.D., Bickford, P.C., 2004. Sulindac improves memory and increases NMDA receptor subunits in aged Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* 25, 315–324. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00116-7)
188. Meyer, D., Bonhoeffer, T., Scheuss, V., 2014. Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron* 82, 430–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.031>
189. Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L.C., Watabe, A.M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M.F., Morris, R.G.M., Morrison, J.H., O'Dell, T.J., Grant, S.G.N., 1998. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433–439. <https://doi.org/10.1038/24790>
190. Mishkin, M., 1978. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus, *Nature*. <https://doi.org/10.1038/273297a0>
191. Mizumori, S.J.Y., Lavoie, A.M., Kalyani, A., 1996. Redistribution of Spatial Representation in the Hippocampus of Aged Rats Performing a Spatial Memory Task. *Behav. Neurosci.* 110, 1006–1016. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.5.1006>
192. Moita, M.A.P., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J.E., Blair, H.T., 2003. Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning. *Neuron* 37, 485–497. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00033-3)

193. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0)
194. Morabito, M.A., Sheng, M., Tsai, L.H., 2004. Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylates the N-Terminal Domain of the Postsynaptic Density Protein PSD-95 in Neurons. *J. Neurosci.* 24, 865–876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4582-03.2004>
195. Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature*. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
196. Morris, R.G.M., Moser, E.I., Riedel, G., Martin, S.J., Sandin, J., Day, M., O'Carroll, C., 2003. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: The role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 358, 773–786. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1264>
197. Mostany, R., Anstey, J.E., Crump, K.L., Maco, B., Knott, G., Portera-Cailliau, C., 2013. Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *J. Neurosci.* 33, 4094–4104. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4825-12.2013>
198. Muller, R.U., Kubie, J.L., Ranck, J.B., 1987. Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J. Neurosci.* 7, 1935–1950. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.07-07-01935.1987>
199. Murmu, R.P., Li, W., Holtmaat, A., Li, J.Y., 2013. Dendritic spine instability leads to progressive neocortical spine loss in a mouse model of huntington's disease. *J. Neurosci.* 33, 12997–13009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5284-12.2013>
200. Murphy, G.G., Fedorov, N.B., Giese, K.P., Ohno, M., Friedman, E., Chen, R., Silva, A.J., 2004. Increased neuronal excitability, synaptic plasticity, and learning in aged Kv β 1.1 knockout mice. *Curr. Biol.* 14, 1907–1915. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.021>
201. Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., Bonhoeffer, T., 2004. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44, 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.016>
202. Nagura, H., Ishikawa, Y., Kobayashi, K., Takao, K., Tanaka, T., Nishikawa, K., Tamura, H., Shiosaka, S., Suzuki, H., Miyakawa, T., Fujiyoshi, Y., Doi, T., 2012. Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding-deficient PSD-95 knockin mice. *Mol. Brain*. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-43>
203. Nakamura, T., Lipton, S.A., 2016. Nitrosative Stress in the Nervous System: Guidelines for Designing Experimental Strategies to Study Protein S-Nitrosylation. *Neurochem. Res.* 41, 510–514. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1640-z>
204. Nelson, C.D., Kim, M.J., Hsin, H., Chen, Y., Sheng, M., 2013. Phosphorylation of threonine-19 of PSD-95 by GSK-3 β is required for PSD-95 mobilization and long-term depression. *J. Neurosci.* 33, 12122–12135.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0131-13.2013>

205. Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V.P., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 65–75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
206. Nicholson, D.A., Trana, R., Katz, Y., Kath, W.L., Spruston, N., Geinisman, Y., 2006. Distance-Dependent Differences in Synapse Number and AMPA Receptor Expression in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* 50, 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.022>
207. Nicholson, D.A., Yoshida, R., Berry, R.W., Gallagher, M., Geinisman, Y., 2004. Reduction in Size of Perforated Postsynaptic Densities in Hippocampal Axospinous Synapses and Age-Related Spatial Learning Impairments. *J. Neurosci.* 24, 7648–7653. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1725-04.2004>
208. Nikonenko, I., Boda, B., Steen, S., Knott, G., Welker, E., Muller, D., 2008. PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J. Cell Biol.* 183, 1115–1127. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805132>
209. Nimchinsky, E.A., Yasuda, R., Oertner, T.G., Svoboda, K., 2004. The Number of Glutamate Receptors Opened by Synaptic Stimulation in Single Hippocampal Spines. *J. Neurosci.* 24, 2054–2064. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5066-03.2004>
210. Nithianantharajah, J., Komiyama, N.H., McKechnie, A., Johnstone, M., Blackwood, D.H., Clair, D.S., Emes, R.D., Van De Lagemaat, L.N., Saksida, L.M., Bussey, T.J., Grant, S.G.N., 2013. Synaptic scaffold evolution generated components of vertebrate cognitive complexity. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nn.3276>
211. Noritake, J., Fukata, Y., Iwanaga, T., Hosomi, N., Tsutsumi, R., Matsuda, N., Tani, H., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Kodama, T., Matsuura, Y., Bredt, D.S., Hamakubo, T., Fukata, M., 2009. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J. Cell Biol.* 186, 147–160. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903101>
212. Nowacka, A., Borczyk, M., Salamian, A., Wójtowicz, T., Włodarczyk, J., Radwanska, K., 2020. PSD-95 Serine 73 phosphorylation is not required for induction of NMDA-LTD. *Sci. Rep.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58989-2>
213. O'Donnel, C., Nolan, M.F., van Rossum, M.C.W., 2011. Dendritic spine dynamics regulate the long-term stability of synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 31, 16142–16156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2520-11.2011>
214. Okabe, S., 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density, *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.01.006>
215. O'Keefe, J., 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 51, 78–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
216. O'Keefe, J., Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.
217. O'Keefe, J., Nadel, L., 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford

University Press, London. <https://doi.org/10.5840/philstudies19802725>

218. Olton, D.S., Paras, B.C., 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17, 669–682. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(79\)90042-3](https://doi.org/10.1016/0028-3932(79)90042-3)
219. Opazo, C.M., Greenough, M.A., Bush, A.I., 2014. Copper: from neurotransmission to neuroproteostasis. *Front. Aging Neurosci.* 6, 143. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00143>
220. Opazo, P., Sainlos, M., Choquet, D., 2012. Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.010>
221. Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
222. Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., Buzsáki, G., 2008. Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321, 1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>
223. Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., Vanleeuwen, J.E., Woolfrey, K.M., 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders, *Nature Neuroscience*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nn.2741>
224. Perez de Arce, K., Varela-Nallar, L., Farias, O., Cifuentes, A., Bull, P., Couch, B.A., Koleske, A.J., Inestrosa, N.C., Alvarez, A.R., 2010. Synaptic clustering of PSD-95 is regulated by c-Abl through tyrosine phosphorylation. *J. Neurosci.* 30, 3728–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2024-09.2010>
225. Petralia, R.S., Wenthold, R.J., 1992. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318, 329–354. <https://doi.org/10.1002/cne.903180309>
226. Poglia, L., Muller, D., Nikonenko, I., 2011. Ultrastructural modifications of spine and synapse morphology by SAP97. *Hippocampus* 21, 990–998. <https://doi.org/10.1002/hipo.20811>
227. Pologruto, T.A., Yasuda, R., Svoboda, K., 2004. Monitoring neural activity and [Ca²⁺] with genetically encoded Ca²⁺ indicators. *J. Neurosci.* 24, 9572–9579. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2854-04.2004>
228. Potier, B., Billard, J.-M., Rivière, S., Sinet, P.-M., Denis, I., Champeil-Potokar, G., Grintal, B., Jouvenceau, A., Kollen, M., Dutar, P., 2010. Reduction in glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats. *Aging Cell* 9, 722–735. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00593.x>
229. Preissmann, D., Leuba, G., Savary, C., Vernay, A., Kraftsik, R., Riederer, I.M., Schenk, F., Riederer, B.M., Savioz, A., 2012. Increased postsynaptic density protein-95 expression in the frontal cortex of aged cognitively impaired rats. *Exp. Biol. Med.* 237, 1331–1340. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012020>
230. Proctor, D.T., Coulson, E.J., Dodd, P.R., 2010. Reduction in Post-Synaptic Scaffolding PSD-95 and SAP-102 Protein Levels in the Alzheimer Inferior Temporal Cortex is Correlated with Disease Pathology. *J. Alzheimers Dis.* 21,

795–811. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100090>

231. Pyapali, G.K., Turner, D.A., 1996. Increased dendritic extent in hippocampal CA1 neurons from aged F344 rats. *Neurobiol. Aging* 17, 601–611. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(96\)00034-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(96)00034-6)
232. Radwanska, K., Medvedev, N.I., Pereira, G.S., Engmann, O., Thiede, N., Moraes, M.F.D., Villers, A., Irvine, E.E., Maunganidze, N.S., Pyza, E. zbieta M., Ris, L., Szymańska, M., Lipiński, M., Kaczmarek, L., Stewart, M.G., Giese, K.P., 2011. Mechanism for long-term memory formation when synaptic strengthening is impaired. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18471–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109680108>
233. Rammes, G., Mattusch, C., Wulff, M., Seeser, F., Kreuzer, M., Zhu, K., Deussing, J.M., Herms, J., Parsons, C.G., 2017. Involvement of GluN2B subunit containing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in mediating the acute and chronic synaptotoxic effects of oligomeric amyloid-beta (A β) in murine models of Alzheimer's disease (AD). *Neuropharmacology* 123, 100–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.02.003>
234. Ramón y Cajal, Santiago., 1896. *El Azul de Metileno En Los Centros Nerviosos*.
235. Rapp, P.R., Stack, E.C., Gallagher, M., 1999. Morphometric studies of the aged hippocampus: I. Volumetric analysis in behaviorally characterized rats. *J. Comp. Neurol.* 459–470.
236. Raz, N., Ghisletta, P., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., Lindenberger, U., 2010. Trajectories of brain aging in middle-aged and older adults: regional and individual differences. *NeuroImage* 51, 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.03.020>
237. Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., Ammassari-Teule, M., 2009. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J. Neurosci.* 29, 8206–8214. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0966-09.2009>
238. Ridderinkhof, K.R., Span, M.M., Van Der Molen, M.W., 2002. Perseverative behavior and adaptive control in older adults: Performance monitoring, rule induction, and set shifting. *Brain Cogn.* 49, 382–401. <https://doi.org/10.1006/brcg.2001.1506>
239. Rogers, J.T., Liu, C.C., Zhao, N., Wang, J., Putzke, T., Yang, L., Shinohara, M., Fryer, J.D., Kanekiyo, T., Bu, G., 2017. Subacute ibuprofen treatment rescues the synaptic and cognitive deficits in advanced-aged mice. *Neurobiol. Aging* 53, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.02.001>
240. Rosenzweig, E.S., Rao, G., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., 1997. Role of temporal summation in age-related long-term potentiation–induction deficits. *Hippocampus* 549–558.
241. Ruszczycski, B., Wlodarczyk, J., Kaczmarek, L., 2014. Method and a System for Processing an Image Comprising Dendritic Spines.
242. Schlüter, O.M., Xu, W., Malenka, R.C., 2006. Alternative N-Terminal Domains of PSD-95 and SAP97 Govern Activity-Dependent Regulation of Synaptic AMPA Receptor Function. *Neuron* 51, 99–111.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.016>

243. Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D.S., Nicoll, R.A., 2002. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.172511199>
244. Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>
245. Shen, J., Barnes, C.A., McNaughton, B.L., Skaggs, W.E., Weaver, K.L., 1997. The Effect of Aging on Experience-Dependent Plasticity of Hippocampal Place Cells. *J. Neurosci.* 17, 6769–6782. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-17-06769.1997>
246. Sheng, M., Hoogenraad, C.C., 2007. The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
247. Sheng, M., Kim, E., 2011. The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005678. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
248. Shimizu, E., Tang, Y.P., Rampon, C., Tsien, J.Z., 2000. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290, 1170–1174. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1170>
249. Śliwińska, M.A., Ca\ly, A., Borczyk, M., Zió\lkowska, M., Skonieczna, E., Chilimoniuk, M., Bernaś, T., Giese, K.P., Radwanska, K., 2020. Long-term Memory Upscales Volume of Postsynaptic Densities in the Process that Requires Autophosphorylation of α CaMKII. *Cereb. Cortex* 30, 2573–2585. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz261>
250. Sonntag, W.E., Bennett, S.A., Khan, A.S., Thornton, P.L., Xu, X., Ingram, R.L., Brunso-Bechtold, J.K., 2000. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. *Brain Res. Bull.* 51, 331–338. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00259-2)
251. Squire, L.R., 1992. Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychol. Rev.* 99, 195–231. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.2.195>
252. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J., Loscalzo, J., 1992. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 444–448. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.444>
253. Stein, V., House, D.R.C., Bredt, D.S., Nicoll, R.A., 2003. Postsynaptic Density-95 Mimics and Occludes Hippocampal Long-Term Potentiation and Enhances Long-Term Depression. *J. Neurosci.* 23, 5503–5506.
254. Steiner, P., Higley, M.J., Xu, W., Czervionke, B.L., Malenka, R.C., Sabatini, B.L., 2008. Destabilization of the Postsynaptic Density by PSD-95 Serine 73 Phosphorylation Inhibits Spine Growth and Synaptic Plasticity. *Neuron* 60, 788–802. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.014>
255. Stewart, M.G., Medvedev, N.I., Popov, V.I., Schoepfer, R., Davies, H.A., Murphy, K.,

- Dallérac, G.M., Kraev, I.V., Rodríguez, J.J., 2005. Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04174.x>
256. Sultana, R., Banks, W.A., Butterfield, D.A., 2010. Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of BCL2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of Abeta, and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 88, 469–477. <https://doi.org/10.1002/jnr.22227>
 257. Sun, X.-Y., Tuo, Q.-Z., Liuyang, Z.-Y., Xie, A.-J., Feng, X.-L., Yan, X., Qiu, M., Li, S., Wang, X.-L., Cao, F.-Y., Wang, X.-C., Wang, J.-Z., Liu, R., 2016. Extrasynaptic NMDA receptor-induced tau overexpression mediates neuronal death through suppressing survival signaling ERK phosphorylation. *Cell Death Dis.* 7, e2449–e2449. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.329>
 258. Temido-Ferreira, M., Ferreira, D.G., Batalha, V.L., Marques-Morgado, I., Coelho, J.E., Pereira, P., Gomes, R., Pinto, A., Carvalho, S., Canas, P.M., Cuvelier, L., Buée-Scherrer, V., Faivre, E., Baqi, Y., Müller, C.E., Pimentel, J., Schiffmann, S.N., Buée, L., Bader, M., Outeiro, T.F., Blum, D., Cunha, R.A., Marie, H., Pousinha, P.A., Lopes, L.V., 2020. Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A2A receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. *Mol. Psychiatry* 25, 1876–1900. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0110-9>
 259. Thibault, O., Landfield, P.W., 1996. Increase in Single L-Type Calcium Channels in Hippocampal Neurons During Aging. *Science* 272, 1017–1020. <https://doi.org/10.1126/science.272.5264.1017>
 260. Toescu, E.C., Verkhratsky, A., Landfield, P.W., 2004. Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci.* 27, 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.010>
 261. Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., Svoboda, K., 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788–794. <https://doi.org/10.1038/nature01273>
 262. Tromp, D., Dufour, A., Lithfous, S., Pebayle, T., Després, O., 2015. Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: Insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Res. Rev.* 24, 232–262. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.006>
 263. Trouche, S., Koren, V., Doig, N.M., Ellender, T.J., El-Gaby, M., Lopes-dos-Santos, V., Reeve, H.M., Perestenko, P.V., Garas, F.N., Magill, P.J., Sharott, A., Dupret, D., 2019. A hippocampus-accumbens tripartite neuronal motif guides appetitive memory in space. *Cell* 176, 1393–1406.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.037>
 264. Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327–1338. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81827-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81827-9)

265. Tsui, J., Malenka, R.C., 2006. Substrate localization creates specificity in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling at synapses. *J. Biol. Chem.* 281, 13794–13804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600966200>
266. Turner, D.A., Deupree, D.L., 1991. Functional elongation of CA1 hippocampal neurons with aging in Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* 12, 201–210. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(91\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0197-4580(91)90098-5)
267. Vallejo, D., Codocedo, J.F., Inestrosa, N.C., 2017. Posttranslational Modifications Regulate the Postsynaptic Localization of PSD-95. *Mol. Neurobiol.* 54, 1759–1776. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9745-1>
268. VanGuilder, H.D., Farley, J.A., Yan, H., Van Kirk, C.A., Mitschelen, M., Sonntag, W.E., Freeman, W.M., 2011. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol. Dis.* 43, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.03.012>
269. Vogl, A.M., Brockmann, M.M., Giusti, S.A., MacCarrone, G., Vercelli, C.A., Bauder, C.A., Richter, J.S., Roselli, F., Hafner, A.S., Dedic, N., Wotjak, C.T., Vogt-Weisenhorn, D.M., Choquet, D., Turck, C.W., Stein, V., Deussing, J.M., Refojo, D., 2015. Neddylation inhibition impairs spine development, destabilizes synapses and deteriorates cognition. *Nat. Neurosci.* 18, 239–251. <https://doi.org/10.1038/nn.3912>
270. Waataja, J.J., Kim, H.J., Roloff, A.M., Thayer, S.A., 2007. Excitotoxic loss of post-synaptic sites is distinct temporally and mechanistically from neuronal death. *J. Neurochem.* 0, 071018045431012-??? <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04973.x>
271. Walikonis, R.S., Jensen, O.N., Mann, M., Provance, D.W., Mercer, J.A., Kennedy, M.B., 2000. Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J. Neurosci.* 20, 4069–4080. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-11-04069.2000>
272. Walsh, M.J., Kuruc, N., 1992. The Postsynaptic Density: Constituent and Associated Proteins Characterized by Electrophoresis, Immunoblotting, and Peptide Sequencing. *J. Neurochem.* 59, 667–678. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09421.x>
273. Wegner, W., Mott, A.C., Grant, S.G.N., Steffens, H., Willig, K.I., 2018. In vivo STED microscopy visualizes PSD95 sub-structures and morphological changes over several hours in the mouse visual cortex. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18640-z>
274. Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097. <https://doi.org/10.1126/science.1128134>
275. Wisden, W., Seeburg, P.H., 1993. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 291–298. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(93\)90120-N](https://doi.org/10.1016/0959-4388(93)90120-N)
276. Won, S., Levy, J.M., Nicoll, R.A., Roche, K.W., 2017. MAGUKs: multifaceted synaptic organizers. *Curr. Opin. Neurobiol.* 43, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.01.006>

277. Wood, E.R., Dudchenko, P.A., Eichenbaum, H., 1999. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397, 613–616. <https://doi.org/10.1038/17605>
278. World Population Ageing 2015, 2015. , New York: United Nations. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2013-000436.195>
279. Xu, T., Yu, X., Perlik, A.J., Tobin, W.F., Zweig, J.A., Tennant, K., Jones, T., Zuo, Y., 2009. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* 462, 915–919. <https://doi.org/10.1038/nature08389>
280. Xu, W., Schlüter, O.M., Steiner, P., Czervionke, B.L., Sabatini, B., Malenka, R.C., 2008. Molecular Dissociation of the Role of PSD-95 in Regulating Synaptic Strength and LTD. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.027>
281. Yang, G., Pan, F., Gan, W.B., 2009. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462, 920–924. <https://doi.org/10.1038/nature08577>
282. Yao, W.D., Gainetdinov, R.R., Arbuckle, M.I., Sotnikova, T.D., Cyr, M., Beaulieu, J.M., Torres, G.E., Grant, S.G.N., Caron, M.G., 2004. Identification of PSD-95 as a Regulator of Dopamine-Mediated Synaptic and Behavioral Plasticity. *Neuron* 41, 625–638. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00048-0)
283. Young, B.J., Fox, G.D., Eichenbaum, H., 1994. Correlates of hippocampal complex-spike cell activity in rats performing a nonspatial radial maze task. *J. Neurosci.* 14, 6553–6563. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-11-06553.1994>
284. Zhao, X., Rosenke, R., Kronemann, D., Brim, B., Das, S.R., Dunah, A.W., Magnusson, K.R., 2009. The effects of aging on N-methyl-d-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience* 162, 933–945. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.018>
285. Zhou, Q., Homma, K.J., Poo, M.M., 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44 VN-r, 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>

8. Supplement

8.1. Makro do analizy kolokalizacji kolców dendrytycznych i PSD-95

Do analizy zdjęć mikroskopowych użyto makr do programu Fiji napisanych w języku Java. Poniżej przedstawiono wykorzystane makro (znakami „//” poprzedzono komentarze do kodu):

```
// ustalenie zmiennych do lokalizacji pliku
path_name=getDirectory("image");
filename=getInfo("image.filename");
im_title=getTitle();
skrot = substring(im_title, 5, 13);
open(path_name+"\\\\"+"done_"+skrot+"_cmle_ch00_contours.tif");
open(path_name+"\\\\"+"done_"+skrot+"_cmle_ch02.tif");

//konwersja na 8-bit
selectWindow("done_"+skrot+"_cmle_ch00.tif");
    run("8-bit");
run("Duplicate...", "title=1");
selectWindow("done_"+skrot+"_cmle_ch00.tif");
    close();

selectWindow("done_"+skrot+"_cmle_ch02.tif");
    run("8-bit");
run("Duplicate...", "title=2");
selectWindow("done_"+skrot+"_cmle_ch02.tif");
    close();

selectWindow("1");
//    close();
selectWindow("2");
//    close();

// wybór okna spine magick
// nazwa okna magick
selectWindow("done_"+skrot+"_cmle_ch00_contours.tif");

// synchronizacja okien
run("Sync Windows");
```

```

// narzędzie ROI Manager do zaznaczenia więcej niż jednego obiektu (kolca
dendrytycznego) na zdjęciu
run("ROI Manager...");
spinenumerator = 0;

setTool("freehand");
for (i = 0; i < 999; i++) {
selectWindow("done_"+skrot+"_cmle_ch00_contours.tif");
Dialog.create("Select spine_no, while finished select 999");
Dialog.addNumber("Spine no:", 0);
Dialog.show();
spineno = Dialog.getNumber();
if (spineno==999) i = spineno;
// wybór zaznaczenia
waitForUser("SYNCHRONIZE and select spine");

// ROI save position
roiManager("Add");
roiManager("Select", spinenumerator);
roiManager("Rename", spineno);
spinenumerator = spinenumerator + 1;

// ustawienie tresholdu dla C2
selectWindow("2");
setThreshold(42, 255);
run("Measure");

selectWindow("Results");
saveAs("Results", path_name+"\\ "+skrot+"_spine_"+spineno+".csv");
run("Clear Results");

run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
display summarize");
selectWindow("Results");
saveAs("Results", path_name+"\\ "+skrot+"_spinedots_"+spineno+".csv");
run("Clear Results");

}

selectWindow("Summary");
saveAs("Text", path_name+"\\ "+skrot+"_spinesummary.csv");
selectWindow("Summary");
run("Close");

```

```

//zapisanie zaznaczeń w ROI manager
roiManager("Select", newArray(spinenumerator));
roiManager("Save", path_name+"\\ "+skrot+"_ROIset.zip");
roiManager("Select", newArray(spinenumerator));
//roiManager("Deselect");
roiManager("Delete");

// zamknięcie okien
selectWindow("done_"+skrot+"_cmle_ch00_contours.tif");
    close();
selectWindow("1");
    close();
selectWindow("2");
    close();
selectWindow("Sync Windows 1.7-fiji1");
    run("Close");
selectWindow("Results");
    run("Close");

// nazwa wykonanego zdjęcia i oczekiwanie na użytkownika
print ("Previous image:");
print (im_title);

waitForUser("Ready for another one?");

//open(path_name +"\\ "+filename);
selectWindow("Log");
    run("Close");

// powtórne uruchomienie makra
runMacro("example.txt");

```


8.2. Makro do analizy poziomu białka

Makro do programu Fiji, wykorzystane do analizy poziomu ekspresji białka PSD-95 po zastosowaniu wektorów wirusowych. Znakami „//” poprzedzono komentarze do kodu.

```
//ustalenie zmiennych do lokalizacji pliku
path_name=getDirectory("image");
filename=getInfo("image.filename")
im_title=getTitle();

//wygładzenie, podział na kanały i konwersja na 8-bit
run("Smooth");
run("Split Channels");

selectWindow("C1-"+im_title);
run("8-bit");

selectWindow("C1-"+im_title);
setThreshold(22, 255);
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
display summarize");

selectWindow("Results");
saveAs("Results", path_name+"\\ "+im_title+"_results_C1.csv");
run("Clear Results");

selectWindow("C1-"+im_title);
run("Measure");

//run("Sync Windows");
selectWindow("Sync Windows 1.7-fiji1");
run("Close");

selectWindow("Results");
saveAs("Results", path_name+"\\ "+im_title+"_results.csv");

selectWindow("Summary");
saveAs("Text", path_name+"\\ "+im_title+"_summary.csv");
```

```
selectWindow("C1-"+im_title);
close();

print ("Previous image:")
print (im_title);
waitForUser("Ready for another one?");

open(path_name +"\\ "+filename);

selectWindow("Log");
run("Close");

selectWindow("Results");
run("Close");
selectWindow("Summary");
run("Close");

runMacro("example1.txt");
```

8.3. Dorobek doktorantki

WYKSZTAŁCENIE

2013 - 2020	Studia doktoranckie III stopnia w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie, w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania
2011 - 2013	Studia magisterskie II stopnia na kierunku Biotechnologia (ukończone z wyróżnieniem), Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie
2008 – 2011	Studia licencjackie I stopnia na kierunku Biotechnologia, Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie

LISTA PUBLIKACJI

1. Śliwińska M.A., **Cały A.**, Szymański J., Radwanska K. Serial Block Face Scanning Electron Microscopy in the Study of the Dendritic Spines. Journal of Visualized Experiments, 2021; **manuskrypt w recenzji**
2. Ziółkowska M., Borczyk M., Nowacka A., Skóra-Nalberczak M., Śliwińska M.A., Robacha M., Łukasiewicz K., **Cały A.**, Skonieczna E., Tomaszewski K.F., Wójtowicz T., Włodarczyk J., Bernas T., Salamian A., Radwanska K. PSD-95 in dorsal CA1 contributes to the persistence of fear memory. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.11.13.381368>; **re-rewizja manuskryptu w eLife**
3. **Cały A.***, Śliwińska M.A.*, Ziółkowska M., Łukasiewicz K., Pagano R., Dzik J., Kalita K., Bernas T., Stewart M., Giese K.P., Radwanska K. PSD-95 in CA1 area regulates spatial choice depending on age. Journal of Neuroscience, 17 March 2021, 41 (11) 2329-2343; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1996-20.2020>; ***pierwszy autor**
4. Śliwińska M.A.*, **Cały A.***, Borczyk M., Ziółkowska M., Skonieczna E., Chilimoniuk M., Bernas T., Giese K.P., Radwanska K. Long-term memory upscales volume of post-synaptic densities in the process that requires autophosphorylation of α CaMKII. Cerebral Cortex, 2020 Apr 14;30(4):2573-2585. doi: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz261>; ***pierwszy autor**
5. Borczyk M., Śliwińska M.A., **Cały A.**, Bernas T., Radwanska K. Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic plasticity. Scientific Reports, 2019 Feb 8;9(1):1693. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38412-7>

6. Beroun A., Nalberczak-Skóra M., Harda Z., Piechota M., Ziółkowska M., **Cały A.**, Pagano R., Radwanska K. Generation of silent synapses in dentate gyrus correlates with development of alcohol addiction. *Neuropsychopharmacology* (2018) 0:1–11; <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0119-4>
7. Mijakowska Z., Łukasiewicz K., Ziółkowska M., Lipiński M., **Trąbczyńska A.**, Matuszek Ż., Łęski S., and Radwanska K. (2015) Autophosphorylation of alpha isoform of calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates alcohol addiction-related behaviors. *Addiction Biology*, 2015 Nov 16. doi: <https://doi.org/10.1111/adb.12327>
8. Chabowska-Kita A., **Trąbczyńska A.**, Korytko A., Kaczmarek M.M., Kozak L.P. Low ambient temperature during early postnatal development fails to cause a permanent induction of brown adipocytes. *The FASEB Journal*. 2015;29(8):3238-3252. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.15-271395>

UCZESTNICTWO W PROJEKTACH NAUKOWYCH

Preludium 11 – 2016/21/N/NZ4/03807 – ‘Neuronal circuits and molecular mechanisms underlying alcohol seeking’, projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki; wykonywany w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie, Polska, 2017-2021 – **kierownik projektu**

Harmonia 4 – 2013/08/M/NZ3/00861 – ‘Alternative mechanism for memory formation in old age’, projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki; wykonywany w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie, Polska, 2013-2016 – współwykonawca projektu

Welcome/2010-4/3 – ‘Nutrition and ambient temperature during early development can reduce susceptibility to obesity’, projekt finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej; wykonywany w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, 2010-2015 – współwykonawca projektu

DONIESIENIA ZJAZDOWE (PLAKATY)

- 2020 FENS 2020, 11-15.07.2020, Glasgow, Szkocja (forum online)
Cały A., Harda Z., Ziolkowska M., Radwanska K.: “Altered alcohol seeking behavior associated with changes in the glutamatergic synapses in central amygdala”
- 2019 4th PhD Student Conference, 2-3.10.2019, Warszawa, Polska
Cały A., Harda Z., Ziolkowska M., Radwanska K.: “The glutamatergic synapses in central amygdala control alcohol seeking behavior”

- 4th Nencki Symposium on: Neurons in action, 11-13.09.2019, Warszawa, Polska
Caly A., Harda Z., Ziolkowska M., Radwanska K.: "The glutamatergic synapses in central amygdala control alcohol seeking behavior"
- 2018 3rd Nencki Symposium on: Neurons in action, 24-25.05.2019, Warszawa, Polska
Caly A., Harda Z., Ziolkowska M., Radwanska K.: "The role of central amygdala neurons activity in alcohol seeking behavior"
- 2017 FENS Regional Meeting, 20-23.09.2017, Pécs, Węgry
Trabczynska A., Sliwinska M.A., Ziolkowska M., Mijakowska Z., Radwanska K.: "Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of CaMKII activity in structural plasticity of dendritic spines"
- 2nd Nencki Symposium on: Neurons in action, 25-26.05.2017, Warszawa, Polska
Trabczynska A., Mijakowska Z., Ziolkowska M., Radwanska K.: "The role of α CaMKII activity in alcohol seeking behavior"
- 2016 Dendritic Anatomy, Molecules and Function – Dendrites 2016, Warsztaty EMBO, 18-21.06.2016, Heraklion, Kreta, Grecja
Trabczynska A., Suska A., Ziolkowska M., Radwanska K.: "Alcohol sensitization leads to morphological and functional changes in the central amygdala and increased alcohol seeking"
- Imaging the Brain, Konferencja EMBO, 18-21.05.2016, Warszawa, Polska
Trabczynska A., Ziolkowska M., Radwanska K.: "Short alcohol exposure leads to functional changes in the central amygdala and increased alcohol seeking"
- NEURONUS 2016 IBRO & IRUN Neuroscience Forum, 22-24.04.2016, Kraków, Polska
Trabczynska A., Suska A., Ziolkowska M., Radwanska K.: "Short alcohol sensitization induces increased alcohol seeking and leads to functional changes in the central amygdala"
- 2015 Aspects of Neuroscience, 27-29.11.2015, Warszawa, Polska
Trabczynska A., Suska A., Ziolkowska M., Radwanska K.: "Alcohol sensitization induces molecular, morphological and functional changes in the central amygdala"
- 2nd Nencki PhD student conference, 27-29.10.2015, Warszawa, Polska
Trabczynska A., Suska A., Ziolkowska M., Radwanska K.: "Alcohol sensitization induces molecular, morphological and functional changes in the central amygdala"

Special Symposium on Emotional Brain, 21-22.05.2015, Warszawa, Polska

Trabczynska A., Robacha M., Ziolkowska M., Radwanska K.: "Characteristics of an animal model of locomotor sensitization to alcohol"

NEURONUS 2015 IBRO & IRUN Neuroscience Forum, 17-19.04.2015, Kraków, Polska

Trabczynska A., Robacha M., Ziolkowska M., Radwanska K. "Characteristics of an animal model of locomotor sensitization to alcohol"

2013 European Congress on Obesity - ECO 2013, 12-14.05.2013, Liverpool, Wielka Brytania

Trabczynska A., Korytko A., Chabowska A., Kozak L.P. 2013. "Impact of reduced ambient temperature during early development on diet-induced obesity in adult mice", Obesity Facts: The European Journal of Obesity: 6(suppl 1): pp. 126.