

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Biologie
Katedra zoologie



Veronika Bláhová

Geny časně odpovědi jako nástroj pro studium prostorové orientace a paměti

Immediate early genes as a tool for study of spatial orientation and memory

Bakalářská práce

Školitel

Mgr. Pavel Němec, PhD.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „ITFs jako nástroj pro studium prostorové orientace a paměti“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 19.8. 2011

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Pavlu Němcovi, PhD. za trpělivost, pomoc a rady při psaní této bakalářské práce a za zapůjčenou literaturu.

Abstrakt

Vlastnosti prostředí, orientační body v prostoru a časové zařazení stavů těla a jeho pohybů jsou stěžejními prvky mapy prostoru vytvářené v mozku („*cognitive map*“). Naše znalosti týkající se toho, jak je v mozku reprezentován prostor a poloha zvířete v tomto prostoru, byly revolučním způsobem rozšířeny s objevem čtyř typů neuronů: místových neuronů („*place cells*“), neuronů směru hlavy („*head direction cells*“), neuronů prostorové mřížky („*grid cells*“) a hraničních neuronů („*border cells*“). Jejich aktivita je závislá na alotetických (zraková a jiná senzorická orientační vodítka) a idiotetických podnětech (informace z propriorecepčního a vestibulárního systému). Mozková centra obsahující výše zmíněné typy neuronů vytváří složitý navigační systém. Geny časné odpovědi („*immediate early genes*“; *IEGs*) a jejich produkty se staly důmyslným nástrojem pro studium neurálního substrátu prostorové orientace včetně orientace magnetické. Pro další výzkum v této oblasti je nezbytné zjistit co nejvíce o dynamice dějů spojených s *IEGs*, což přispěje k lepšímu porozumění činnosti mozkových center zapojených v navigačním systému hlodavců („*rodent navigation circuit*“). Tato práce shrnuje poznatky o prostorové orientaci obratlovců se zaměřením na hlodavce v kontextu detekce exprese *IEGs* jako aktivitních markerů v neurálním substrátu. Jsou zde zmíněny nejběžnější experimentální bludiště a nejčastější detekční metody používané v souvislosti s funkčním mapováním neuronálních sítí, včetně limitů a metodických obtíží spjatých s jejich použitím.

Klíčová slova: geny časné odpovědi, prostorová orientace, navigační systém hlodavců, hipokampus

Abstract

Properties of the environment, spatial orientation cues and time-shifting movements are essential for cognitive maps. The understanding of how both space and the animal's position within that space are represented in the brain has been significantly advanced by the discoveries of four principal neuronal types: the place cells, the head direction cells, the grid cells and border cells. Their activity being driven by both allothetic (visual and non-visual landmarks), and idiothetic cues (internal movement cues based on proprioceptive and vestibular information). Brain regions containing aforementioned types of neurons constitute complex spatial representation system. Immediate early genes (*IEGs*) and their products became sophisticated tool for the study of neural substrate of spatial orientation including magnetic orientation. For further research it is unavoidable to uncover the dynamic of processes related to *IEGs* in order to better understanding the functions of brain centres involved in rodent navigation circuit. This work summarises our knowledge about spatial orientation of the vertebrates aimed at rodents, in context with detection of *IEGs* expression as activity markers in neural substrate. There are described most common experimental mazes and most frequent detection methods used in connection with functional mapping of neural networks limitations and pitfalls of the functional neuroanatomical mapping based on *IEG* detection.

Keywords: immediate early genes, spatial orientation, rodent navigation circuit, hippocampus

Obsah

1. Úvod
2. Fyziologická podstata prostorové orientace u hlodavců
 - 2.1. Místové neurony („place cells“; PC)
 - 2.2. Neurony směru hlavy („head direction cells“; HDC)
 - 2.3. Neurony prostorové mřížky („grid cells“; GC)
 - 2.4. Hraniční neurony („border cells“; BC)
3. Neurální substrát prostorové orientace – „rodent navigation circuit“
4. Nejběžnější testy prostorové orientace
 - 4.1. Radiální bludiště a bludiště typu „T“
 - 4.2. Morrisovo vodní bludiště a odvozené testy
5. Geny časné odpovědi („immediate early genes“) jako markery neuronální aktivity
6. Metody detekce exprese IEGs
 - 6.1. Imunocytochemické metody
 - 6.2. *In situ* hybridizace a odvozené metody
7. Exprese IEGs při testech prostorové orientace
8. Vliv změn přirozeného magnetického pole na prostorovou orientaci
9. Závěr
10. Použitá literatura

1. Úvod

Teorie o orientaci živočichů vznikaly zároveň s teoriemi o učení a paměti. Na počátku minulého století byla schopnost zvířat orientovat se v prostoru vysvětlována pomocí spojení stimulace (vlastnosti prostředí) s reakcí, resp. asociací (jít doleva, doprava, rovně,...). Vše bylo vysvětlováno poměrně jednoduchým principem vstupů a výstupů, aniž by se uvažovalo o nějaké vnitřní fyziologické podstatě.

Jako první se o náznaku existence vnitřních map zmiňuje Tolman (1930). V roce 1948 Tolman zjistil, že potkani při testech v Morrisově vodním bludišti používají zkratky. Falzifikoval tak předchozí hypotézu možnosti existence pouhého přímého spojení stimulu a behaviorální odpovědi. Tolman usoudil, že potkani jsou schopni vytvářet a používat „kognitivní mapy“ fyzického prostředí („*cognitive maps*“), ve kterém se pohybují nebo plní experimentální úlohy. To vedlo k přesnější formulaci představy o existenci kognitivních map: „...*potkani si selektivně vytvářejí kognitivní mapu. Aktivně vyhledávají podněty významné pro konstrukci této mapy a nikoliv pouze pasivně přijímají a reagují na podněty, které jsou fyzicky přítomné*“ (Tolman, 1948). Tolmanova hypotéza byla oživena až O'Keefem a Nadelem (1978), kteří označili hipokampus za oblast mozku důležitou pro mapování okolního prostředí. Hypotézu podpořil O'Keefe objevením hipokampálních buněk, tzv. místových neuronů – „*place cells*“, jejichž zvýšená aktivita závisí na výskytu živočicha na konkrétním místě v prostředí.

Existence kognitivních map je dlouho diskutovaným elementem teorií o podstatě prostorové orientace živočichů. Kognitivní mapa byly různými autory nazírána a definována různě (review viz. Bennett 1996): Downs (1973) hovoří o „*procesu složeném ze série psychologických interpretací, pomocí kterých je jedinec schopný získávat, kódovat, skladovat, dekódovat a vzpomínat si na informace o relativních pozicích a vlastnostech jevů ve svém prostředí*“; Thinus-Blanc (1988) o „*alocentricky organizované reprezentaci výrazných prvků prostředí*“ a Gallistel (1989) ji charakterizuje jako „*záznam v centrálním nervovém systému o makroskopických geometrických vztazích povrchů prostředí používaného pro plánování přesunů v rámci tohoto prostředí*“.

Výzkum kognitivních map a orientace živočichů se během posledních let čím dál více přesouvá z etologických do molekulárních úrovní. Součinnost buněčných dějů ovlivňuje nejen základní fyziologické podmínky, ale také řídí formování a přetváření paměťových stop.

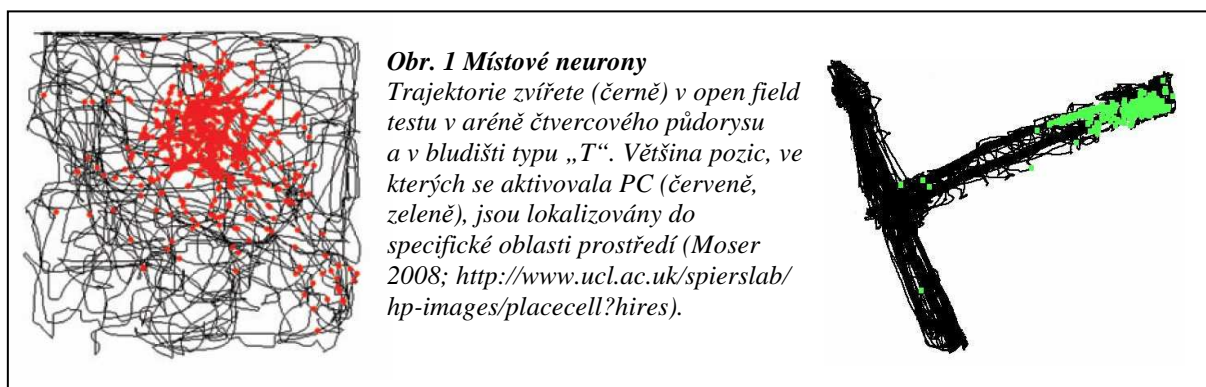
V následujících odstavcích shrnuji základní informace o systému, který podle dosavadních studií umožňuje obratlovcům vytvářet a používat mapu prostředí, ve kterém se nachází. Navigační systém hlodavců („*rodent navigation circuit*“) zde zmiňuji proto, že většina experimentů se provádí u hlodavců a moje diplomová práce bude zaměřená převážně na ně. Ráda bych v této práci shrnula poznatky o testování prostorové orientace savců s použitím detekčních metod využívajících „*immediate early genes*“. Kapitoly jsou řazené od uvažovaných anatomických center přes detekční metody s IEGs až po aplikace v testování magnetorecepce.

2. Fyziologická podstata prostorové orientace u hlodavců

Navigace má dvě složky – směřování („*determination*“) a udržování kursu („*maintaining*“) (Gallistel 1989). Směřování k cíli a vracení se do bodu startu je běžnou součástí navigace mnoha, ne-li většiny obratlovců. Startem nebo cílem může být zdroj potravy, hnízdo, nora nebo místo rozmnožování. Vodítkem pro orientaci jsou význačné charakteristiky prostředí zprostředkované smyslovým vnímáním. V kontextu dnešních znalostí se zdá, že na vzniku multimodální, kognitivní mapy alocentrického prostoru se podílí čtyři typy neuronů: místové neurony („*place cells*“; PC), neurony směru hlavy („*head direction cells*“; HDC), neurony prostorové mřížky („*grid cells*“; GC) a recentně objevené hraniční neurony („*border cells*“; BC).

2.1. Místové neurony („*place cells*“; PC)

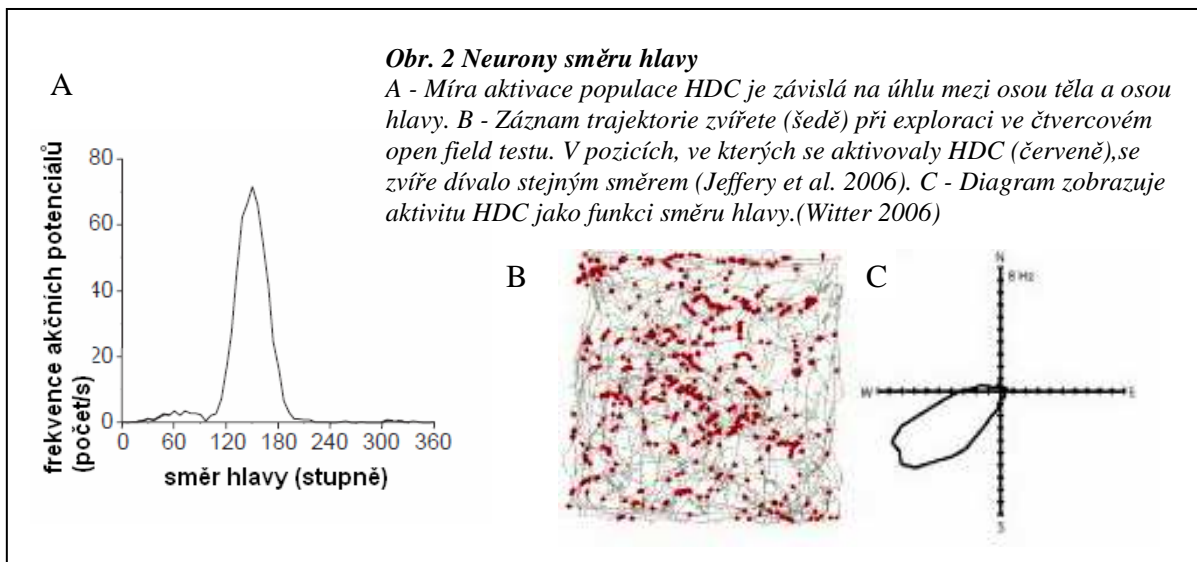
Existenci místových neuronů jako první popsali O'Keefe a Dostrovski (1971). Místové neurony reagují intenzivní palbou akčních potenciálů, pokud se zvíře dostane na určité konkrétní místo alocentrického prostoru, tzv. **místové pole** („*place field*“; Obr. 1). Vlastnosti PC mají pyramidální neurony CA1 – 3, granulární buňky *gyrus dentatus* hipokampu, a také některé neurony v subikulu. Jednotlivým PC odpovídají různá místová pole, populace PC tedy vytváří vnitřní reprezentaci okolí zvířete (Muller et al. 1991). Místové neurony ani jim odpovídající místová pole však nejsou topograficky uspořádány (Wilson and McNaughton 1993; Redish et al. 2001). PC jsou multimodální, u hlodavců je však jejich aktivita dominantně ovlivněna zrakovými vodítky (Muller 2002).



Mnoho studií zaměřených na struktury obsahující PC se shoduje v závěru, že PC jsou důležité pro doplnění vzorců („*pattern completion*“), tzn. asociace znalosti experimentálního prostoru na prostor modifikovaný (O'Keefe and Conway 1978). Další funkcí PC je schopnost separace vzorců („*pattern separation*“), tzn. schopnost kombinace původního záznamu prostoru s jinými paměťovými záznamy (Wood et al. 2000).

2.2. Neurony směry hlavy („*head direction cells*“; HDC)

Neurony směru hlavy popsal ve své práci Ranck (1984). Tyto neurony zvyšují svou aktivitu tehdy, když zvíře natočí hlavu určitým směrem v horizontální rovině alocentrického prostoru tzv. **preferovaným směrem** - „*preferred firing direction*“ (Taube 2007); Obr. 2. HDC byly identifikovány v postsubikulu (Taube et al. 1990), v granulózní i agranulózní retrosplenální kůře (Chen et al. 1994), anterodorsálním thalamickém jádře (Taube 1995), laterodorsálním thalamickém jádře (Mizumori and Williams 1993), laterálním mammilárním jádře (Blair 1998; Stackman and Taube 1998), dorsálním tegmentálním jádře (Sharp et al. 2001), dorsálním striatu (Wiener 1993; Mizumori et al. 2000) a dalších oblastech. Většina HDC se vyskytuje v postsubikulu a anteriorním thalamu (Sharp 2002).

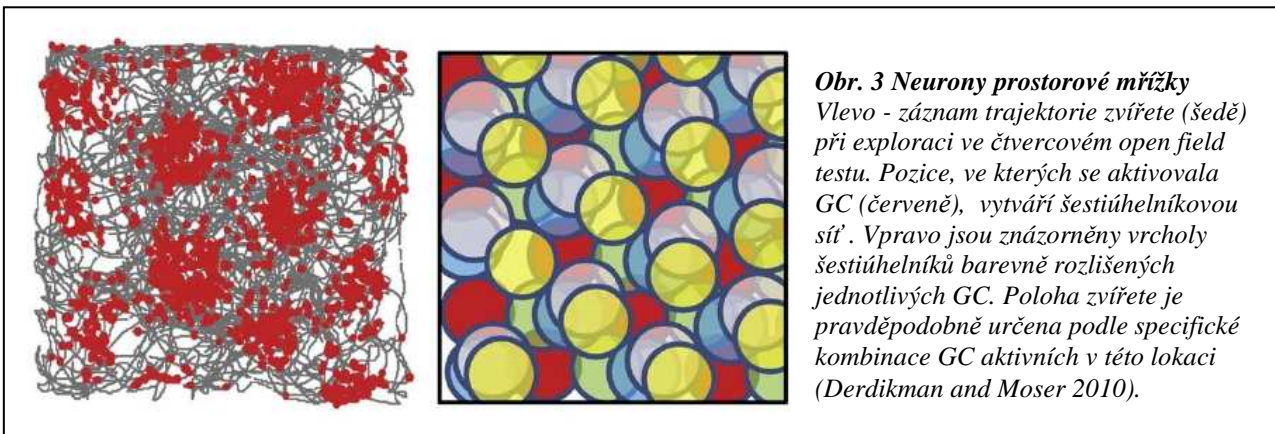


Aktivita HDC není primárně ovlivněna momentální pozicí těla zvířete ani jeho chováním, ale i přesto byly v této souvislosti zaznamenány určité korelace ve výsledcích prostorových testů (Dudchenko and Taube 1997). HDC jsou multimodální, avšak idiotetická informace, zejména informace z vestibulárního systému, je nezbytná pro jejich standardní směrově determinovanou aktivitu (Dudchenko 2003). Jednotlivé HDC mají různé preferované

směry v různých prostředích. S tím souvisí také kalibrace HDC, resp. jejich preferovaného směru pomocí zrakových orientačních vodítek (Taube 2002). Při testování aktivity HDC se navíc ukázalo, že startovní bod při testu je pro zvíře důležitý jako referenční bod kalibrace směrové preference HDC.

2.3. Neurony prostorové mřížky („grid cells“; GC)

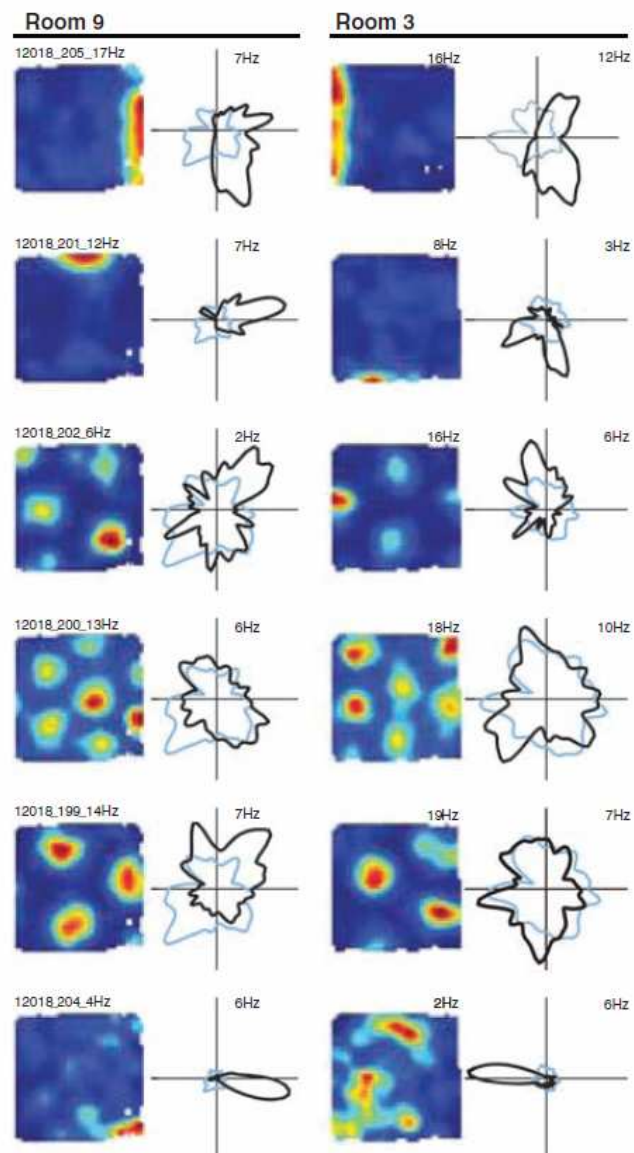
Neurony prostorové mřížky objevil recentně Hafting a kol. (2005). GC se vyskytují v entorhinální kůře spolu s PC a HDC (Fyhn et al. 2004), dále také v presubikulu a parasubikulu smíšeně s HDC a BC (Boccarda et al 2010). HDC jsou zvláštní tím, že jejich periodická aktivační pole („*firing fields*“) vytváří trojúhelníkovou, resp. šestiúhelníkovou síť prostředí (Obr. 3). Aktivační pole jednotlivých GC se liší v rozložení sítě a orientaci trojúhelníků (Fyhn et al. 2004; Hafting et al. 2005). Každý trojúhelník je charakteristický svým umístěním (vzdáleností od dalších trojúhelníků), orientací vůči ose určené vnějším prostředím a posunem v „souřadnicovém“ systému daném orientačními vodítky (Moser et al. 2008). Aktivační pole jednotlivých GC entorhinální kůry se systematicky mění v dorsoventrálním směru tak, že se zvětšuje měřítko trojúhelníkové sítě, tj. v dorsální kůře jsou si vrcholy trojúhelníkové sítě blíže než v kůře ventrální (Brun et al. 2008). GC mají pravděpodobně zásadní význam pro odhad vzdáleností, podílí se na integraci dráhy a výrazně ovlivňují aktivitu PC (Moser et al. 2008). Podobně jako PC, nejsou ani GC uspořádány topograficky (Moser et al. 2008). Umístění aktivačních polí jednotlivých GC se liší polohou vrcholů tak, aby každá část prostředí byla monitorována subpopulací GC (Obr. 3 vpravo).



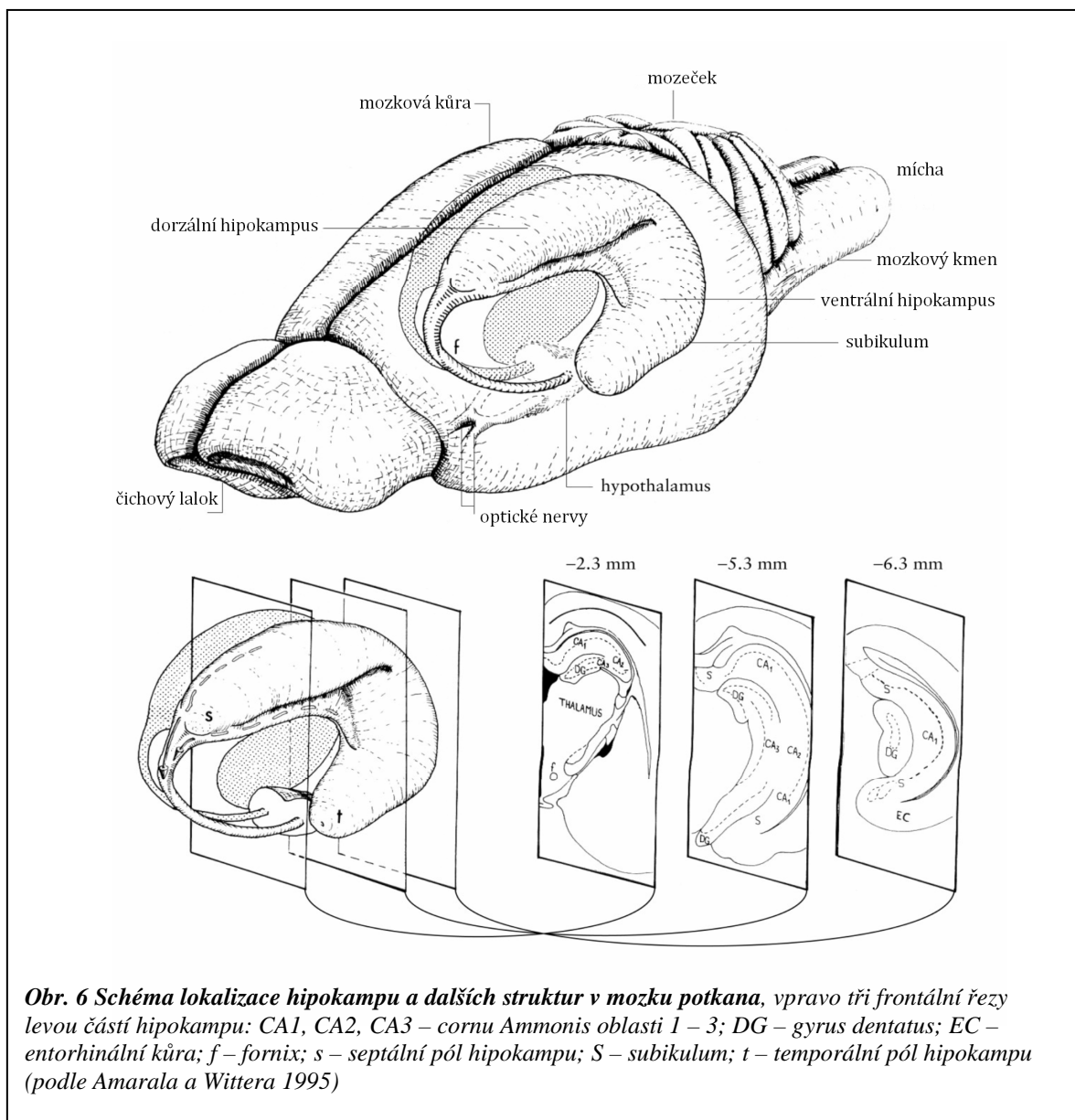
2.4. Hraniční neurony („border cells“; BC)

Posledně objeveným typem neuronů jsou hraniční neurony („border cells“; BC). Vyskytují se spolu s GC, PC a HDC v mediální entorhinální kůře a parasubikulu. K jejich aktivaci dochází při přiblížení k okraji experimentálního prostoru (Obr. 4). O jejich existenci uvažoval Burgess a kolegové už v roce 2000, ale popsány byly až v nedávné době (Solstad et al. 2008). BC se vyskytují poměrně řídko - zahrnují cca 10 % neuronů lokální populace. Funkce neuronů nejsou v tomto případě striktně určené, ale v různých prostředích mohou přejímat funkci jiného typu neuronu, př. GC nebo HDC může mít vlastnosti BC. Přes BC se mohou informace o překážkách a okrajích dostat ke GC, ale také k dalším strukturám zapojených do navigačního systému díky eferentním spojmům entorhinální kůry s hipokampem (Whitlock et al. 2008). BC mohou představovat referenční rámce pro orientaci v prostoru – umožňují určovat vzdálenosti a zaostřují aktivační pole GC či PC.

Obr. 4 Mapy aktivity neuronů a diagramy pro dvě BC (1. a 2. řádek), tři GC (3. – 5. řádek) a jednu HDC (6. řádek) ve dvou různých prostředích. BC, GC a HDC souvisle reagují na změny prostředí (neurony měřeny simultánně) – Solstad et al. 2008



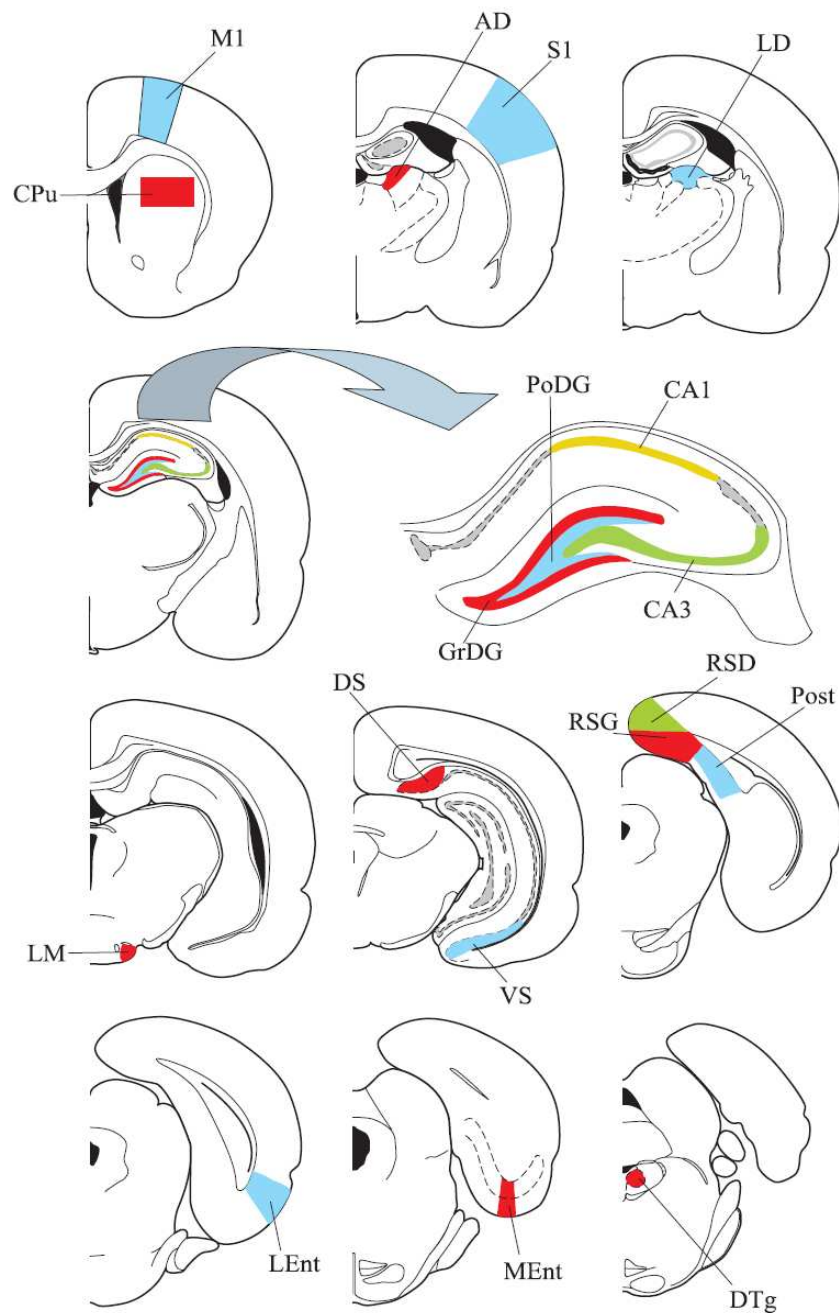
Hipokampus jakožto neurální substrát kognitivní mapy rozeznali O'Keefe a Nadel (1978). Role hipokampu v prostorové orientaci byla posléze experimentálně ověřena (Morris 2001) a jeho funkce v prostorové orientaci je dnes poměrně detailně objasněná (Moser et al. 2008). Jedním ze současných nedořešených otázníků v oblasti hypotéz kognitivních map vznikajících ve strukturách navigačního systému je neznámý mechanismus synchronizace PC, které jsou součástí mapy jednoho prostředí a zároveň jsou zapojené do jiných map, ve kterých mají jiné aktivační pole. Také se neví, jaký počet PC je nezbytně nutný pro vytvoření jedné kognitivní mapy. S největší pravděpodobností však existuje více než jedna mapa prostoru – např. mapy v hipokampu a v entorhinálním kůře jsou zřejmě navzájem funkčně propojené.



Obr. 6 Schéma lokalizace hipokampu a dalších struktur v mozku potkana, vpravo tři frontální řezy levou částí hipokampu: CA1, CA2, CA3 – cornu Ammonis oblasti 1 – 3; DG – gyrus dentatus; EC – entorhinální kůra; f – fornix; s – septální pól hipokampu; S – subikulum; t – temporální pól hipokampu (podle Amarala a Wittera 1995)

Jak již bylo zmíněno výše, HDC byly popsány v několika podkorových centrech, postsubikulu, retrosplenální a entorhinální kůře (Obr. 5, Taube 2007). Vestibulární systém projikuje do dorzálního tegmentálního jádra a to dále přes laterální mamilární jádro do thalamu, kam se dostává informace i ze zrakového systému. Vnitřní spoje HDC systému jsou komplexní, s entorhino-hipokampální systémem komunikuje prostřednictvím postsubikula a entorhinální kůry.

Na tomto místě je třeba také zmínit, že některá centra navigačního systému, jakými jsou hipokampus, anteriorní jádra talamu, mamilární jádra a retrosplenální kortex hrají rovněž zásadní roli v kontextuálním učení a paměti (Aggleton and Pearce, 2001). Například místové neurony hipokampu (pyramidální neurony) mají významnou roli ve formování a konsolidaci kontextově specifické episodické paměti (Wood et al. 2000; Ferbinteanu and Shapiro 2003; Moita et al. 2003; Leutgeb et al. 2005).



Obr. 7 Diagram frontálních řezů mozku u myši zobrazující 18 oblastí zapojených do „rodent navigation circuit“.

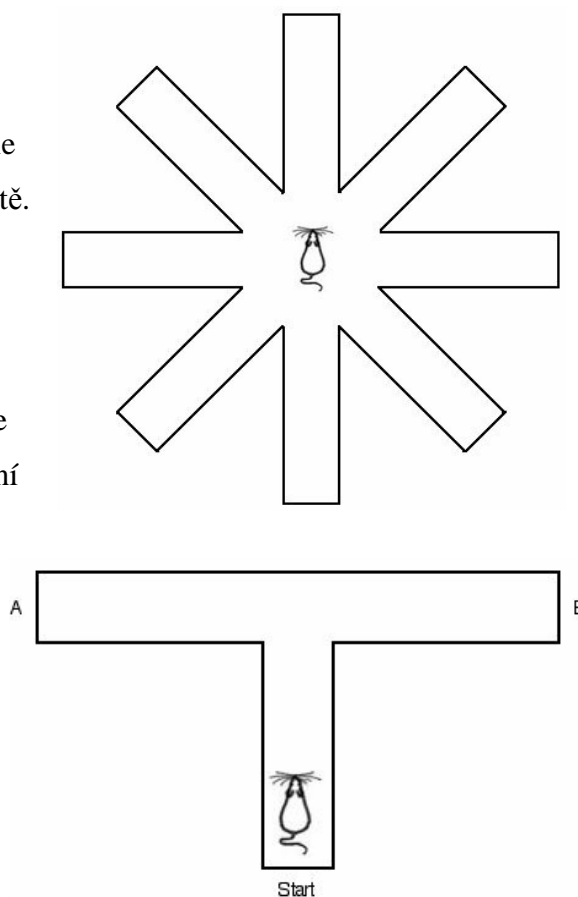
Zkratky: AD – anterodorzální thalamické jádro; CA1 – CA1 oblast hipokampu; CA3 – CA3 oblast hipokampu; Cpu – striatum (caudate putamen); DS – dorzální subikulum; DTg – dorzální tegmentální jádro; GrDG – granulární vrstva gyrus dentatus; LD - laterodorzální thalamické jádro; LEnt – laterální entorhinální kůra; LM – laterální mamilární jádro; M1 – primární motorická kůra; MEnt – mediální entorhinální kůra; PoDG – polymorfní vrstva gyrus dentatus; Post – postsubikulum; RSD – retrosplenální granulární kůra; S1 – primární somatosensorická kůra; VS – ventrální subikulum (schémata převzata z Paxinos a Watson 2005, dle Burgera et al. 2010)

4. Nejběžnější testy prostorové orientace

4.1. Radiální bludiště a bludiště typu „T“

Radiální bludiště se skládá z jedné centrální plošiny s obvykle osmi, ale i více rameny. Jako první použil podobné bludiště Tolman (1948), ale dnešní podobu tohoto experimentálního prostředí zavedl Olton (1978). Používá se pro testování pracovní i referenční paměti. Zvířata se učí hledat odměnu na koncích ramen a hodnotí se chybovost; opakovaná návštěva ramene nebo jeho vynechání. Zvíře bez hipokampu je v tomto testu méně úspěšné, což Olton (1978) interpretuje jako důsledek narušení pracovní paměti. O'Keefe a Nadel to spíše přisuzují absenci hipokampu jakožto neuronálního substrátu kognitivní mapy.

Bludiště typu „T“ využívá instinktivní vlastnost zvířete – explorace za účelem objevování a zkoumání nových prostředí. Zvíře v testu tedy obvykle preferuje nové rameno více než známé rameno bludiště. Bludiště typu „T“ se často využívá při studiu určité složky prostorové paměti. Zvíře začíná na konci „T“ ramene a má na výběr dvě ramena (A a B). Při alternačních testech („*T maze alternation*“) se sleduje náhodný výběr ramen bez odměny. Testování pracovní paměti („*working memory*“) je náročnější variantou alternačního testu s odměnou – zvíře si musí zapamatovat, ve kterém rameni bylo pro odměnu v přechodném testu a toto rameno při následujícím testu znovu nenavštíví. Při testování referenční paměti („*reference memory*“) si zvíře musí zapamatovat rameno s odměnou a navštívuje ho při každém testu. Při řešení úkolů na podobné bázi se aktivuje například hipokampus, septum nebo prefrontální kůra.



Obr. 8 Schéma radiálního bludiště (nahore) a bludiště typu „T“ (dole)
(<http://www.ratbehavior.org/RatsAndMazes.htm#T-Maze>)

4.2. „Open field“ testy a Morrisovo vodní bludiště

„Open field“ test (Obr. 9) není klasickým bludištěm – je to otevřený prostor bez překážek a výrazných rysů prostředí, obvykle kruhového nebo čtvercového půdorysu. Podmínky arény se dají snadno přizpůsobit požadavkům experimentátora.

Morrisovo vodní bludiště (Obr. 10), odvozené od „open field“ testů, je jedním z nejvíce používaných testů prostorové orientace a paměti.

Jedná se o kruhovitou arénu, bazén naplněný vodou obarvenou obvykle mlékem, netoxickou barvou nebo latexem. Úkolem zvířete je najít ostrůvek skrytý těsně pod hladinou, jehož poloha se mění nebo zůstává stejná. Někdy mohou být na vnitřních stěnách bazénu umístěny orientační značky. Morrisovo vodní bludiště bylo původně určené pro testování prostorové orientace potkanů (Morris 1984 ex. Lipp 1998). Dnes je široce využíváno v biomedicíně a farmakologickém výzkumu.

Principiálně jednoduchým příkladem potvrzení existence kognitivních map je testování potkana, který po několika testech s konstantně umístěným ostrůvkem podstatně zkrátí dobu mezi startem a nalezením ostrůvku. Potkan si rychle zapamatuje polohu orientačních bodů a vytvoří si kognitivní mapu experimentální arény (D'Hooge and De Deyn 2001).

Testování prostorové orientace zvířat není založené pouze na pozorování aktivity neovlivněného zvířete. Výsledky testů v radiálním bludišti a v „open field“ testech ukazují, že experimentální zvířata s lézemi hipokampu nejsou schopna si vytvořit paměťový záznam prostoru (O'Keefe 1978; Nakazawa et al. 2004). Při důkladnější analýze dat se zjistilo, že učení v testech prostorové orientace bylo horší u experimentálních zvířat s dorzální, nikoli

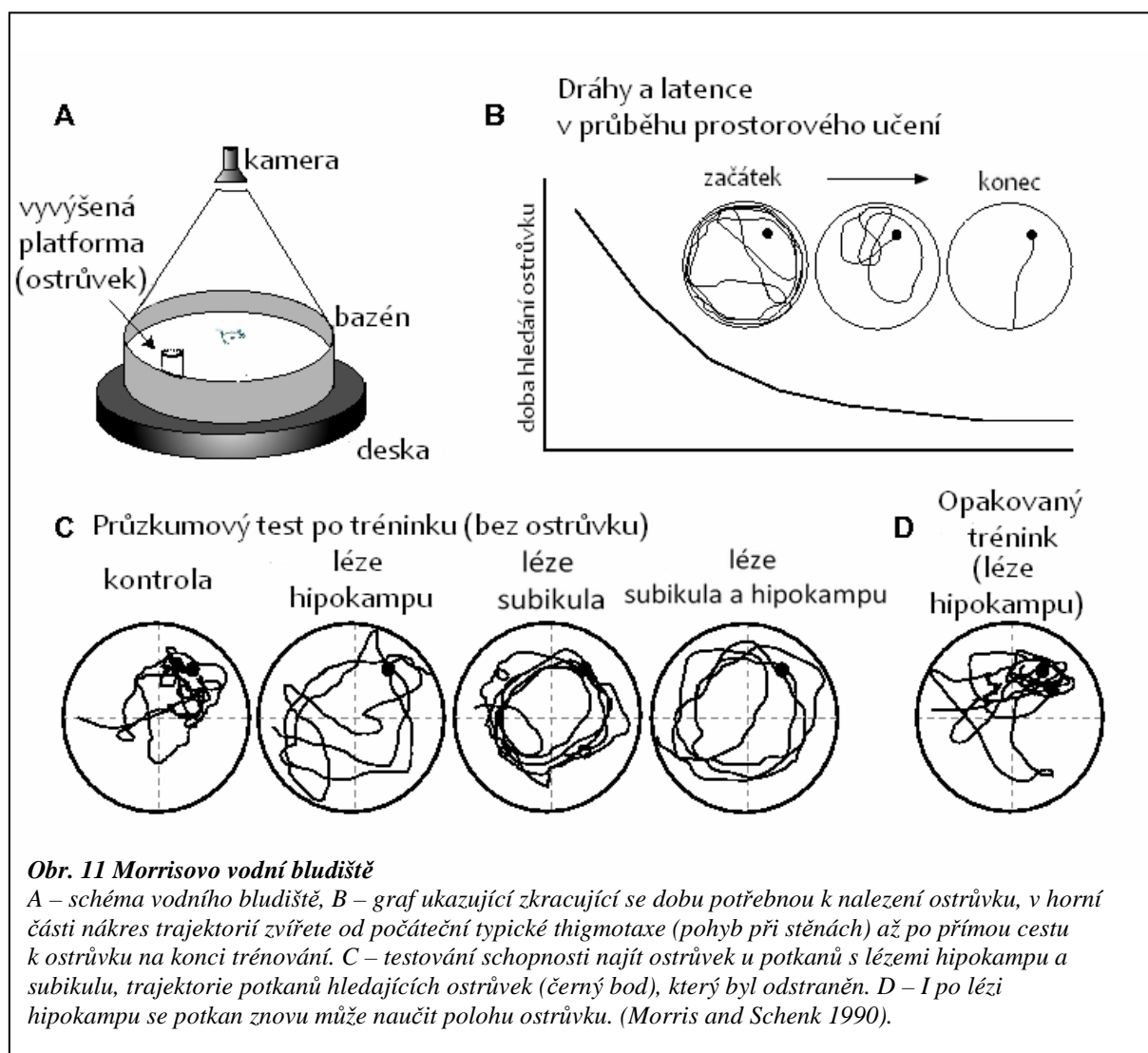


Obr. 9 „Open field“ test (Chadi Touma, Max Planck Institut of psychiatry, Mnichov)



Obr. 10 Morrisovo vodní bludiště (http://www.scholarpedia.org/article/Morris_water_maze)

však s ventrální lézí hipokampu (Sinnamon 1978). Poškození hipokampu u nich vedlo k neúspěchu v úlohách zaměřených na prostorovou paměť (Obr. 11), ale v přítomnosti zrakových vodítek byly schopni úlohu úspěšně absolvovat. Morrisovo vodní bludiště bylo použito i pro srovnání schopností orientace různých kmenů myši v testech prostorové orientace a paměti. Jednotlivé kmeny se podle výsledků liší ve svých behaviorálních vlastnostech, přičemž nejlepších výsledků z porovnávaných kmenů dosáhl kmen C57BL/6 (Gerlai 2002). K této skutečnosti je vhodné přihlédnout při výběru experimentálního zvířete. Tento kmen laboratorní myši bychom proto použili při testování vlivu změn přirozeného magnetického pole na prostorovou orientaci.



5. Geny časné odpovědi („immediate early genes“) jako markery neuronální aktivity

„*Immediate early genes*“ (IEGs) jsou geny časné odpovědi, jejichž exprese se rychle a krátkodobě zvyšuje při nejrůznějších stimulacích buňky. Jejich typickou vlastností je tedy přímá indukovatelnost, tj. k jejich transkripci a následné translaci dochází bezprostředně po relevantním stimulu (Herrera and Robertson 1996). Navíc se IEG produkty v buňkách rychle kumulují. Objev dynamické regulace IEGs v centrální nervové soustavě vedl k intenzivnímu výzkumu jejich funkce a především k využití produktů těchto genů jako markerů neuronální aktivity. IEGs se účastní mnoha dějů, od organogeneze, postnatálního neuronálního vývoje až po neuronální plasticitu u dospělých jedinců. IEGs se také řadí mezi důležité prvky procesů rychlé buněčné odpovědi spojené se změnami v neuronální aktivitě (Herdegen and Leah, 1998). Metody funkčního mapování založené na detekci exprese IEGs proto nachází široké uplatnění při studiu neuronálního substrátu chování a kognice. Praktické výhody tohoto přístupu vyvažují fakt, že se role IEGs v buněčných procesech a funkcích stále nedaří zcela objasnit. Na rozdíl od elektrofyziologických metod umožňuje neuroanatomické funkční mapování **studování chování intaktních zvířat a analýzu vzorů neuronální aktivity v celém nervovém systému**. Jisté omezení použití jednoho konkrétního IEGs, resp. jeho produktu, je spektrum podnětů jeho aktivity v konkrétním neuronálním systému (Herdegen 1996). Proto je důležité si ověřit citlivost daného IEG před začátkem experimentu. Metoda navíc nemá časové rozlišení, které by umožnilo studium dynamiky stimulu a odpovědi. Proto poskytuje pouze korelativní data a nemůže tedy plnohodnotně nahradit studie elektrofyziologické.

IEGs kódují proteiny s různou funkcí, často se však jedná se o transkripční faktory regulující expresi genů pozdní odpovědi („*late-response genes*“), nebo o strukturní proteiny (Farivar a kol. 2004). Mezi tzv. indukovatelné transkripční faktory (ITFs) patří např. *c-Fos* a *Egr-1*, mezi strukturní proteiny *Arc*. Zmíněné IEGs se používají pro účely funkčního mapování nejčastěji, a proto se na ně zaměřuji v následujících odstavcích.

IEG *c-fos* byl charakterizován jako první a proto je také nejvíce používaným aktivním markerem. Úroveň hladiny jeho exprese je v klidovém stavu na poměrně nízké bazální úrovni. To se ukazuje jako výhoda pro snadnější identifikaci změn transkripce, která nastává už po několika minutách od začátku stimulace. Nejvyšší úroveň hladiny mRNA dosahuje po 20 - 60 minutách, aby po cca 2 hodinách opět poklesla na bazální úroveň.

Translace dosahuje maxima po přibližně 1-2 hodinách, ale na původní úroveň se vrací mnohem pomaleji (Zangenehpour and Chaudhuri 2002). Nízká koncentrace *c-Fos* v klidové stavu je způsobena nestabilitou jeho mRNA a také negativní zpětnou vazbou. Výhodné je použít *c-Fos* v případě, že chceme studovat reakce na nový podnět nebo stimulaci provádíme po dlouhodobé deprivaci smyslů. Použití *c-Fos* při dlouhodobých stimulacích je nevýhodné – získané výsledky jsou neprůkazné díky nízkým úrovním exprese (Chaudhuri a kol. 2000). Kódující oblasti genu *c-fos* nejsou příliš konzervativní, což stěžuje mezidruhové srovnání, nicméně jsou již dnes již komerčně dostupné protilátky schopné rozeznávat konkrétní epitopy jednotlivých členů Fos skupiny (Farivar, Zangenehpour et al. 2004).

IEG *egr-1* (známý také jako *zif268*, *krox-24*, *NGFI-A*, *tis 8* a *ZENK*) se liší od *c-fos* vysokou bazální úrovní exprese v některých oblastech mozku, např. ve zrakové kůře (Kaczmarek and Chaudhuri 1997). To je zapříčiněno tím, že *Egr-1* na rozdíl od *c-Fos* nepodléhá negativní zpětné vazbě. Jeho kumulace v buňkách je proto dlouhodobější a díky tomu je vhodným markerem v experimentech používajících dlouhodobější stimulaci. Výhodou je rozdílná dynamika exprese *c-fos* a *egr-1* a oba markery mohou být používány v jednom experimentu. Nicméně při analýze výsledků je třeba mít na paměti, že různé oblasti mozku vykazují rozdílnou expresi těchto dvou IEGs při stejné stimulaci. U *egr-1* byla zjištěna silná konzervace kódujících oblastí (Long and Salbaum 1998). Z pohledu metodiky experimentu se tato skutečnost jeví výhodnou z důvodu porovnatelných výsledků různých studií na různých druzích.

Arc - „*activity-regulated cytoskeleton factor*“ (známý také jako *Arg 3.1*) je novějším nástrojem funkčního mapování. *Arc* se zkoumá hlavně v souvislosti s konsolidací paměti („*memory consolidation*“) a některými funkcemi hipokampu, zvláště s prostorovým učením (Guzowski et al. 2001). Je to zatím jediný známý IEG, jehož mRNA i protein můžeme najít v dendritech. Upregulace *Arc* mRNA a proteinu je asociována se zvýšenou synaptickou aktivitou (Steward et al. 1998).

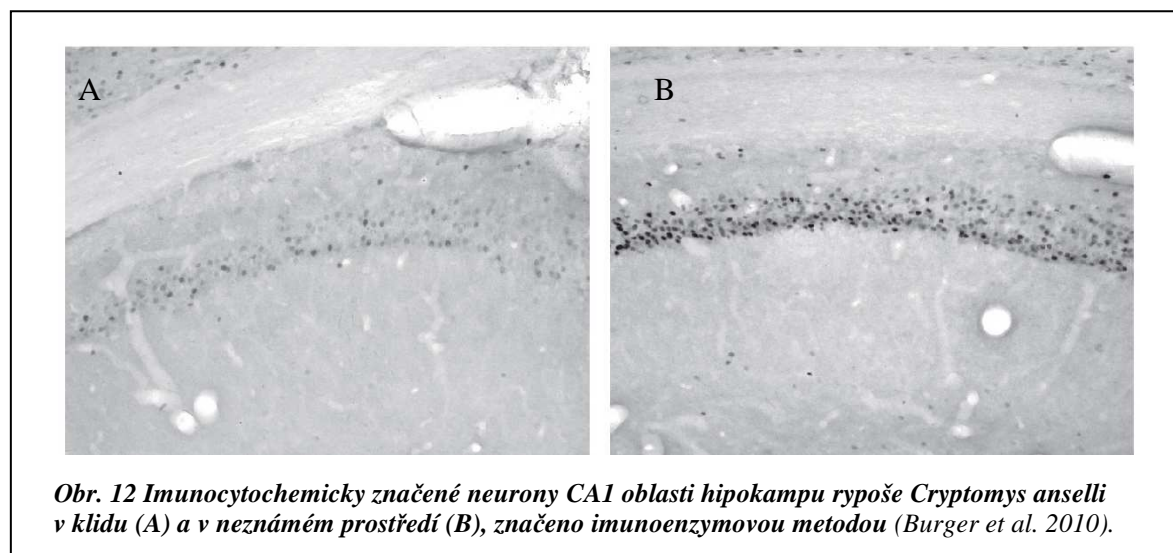
6. Metody detekce exprese IEGs

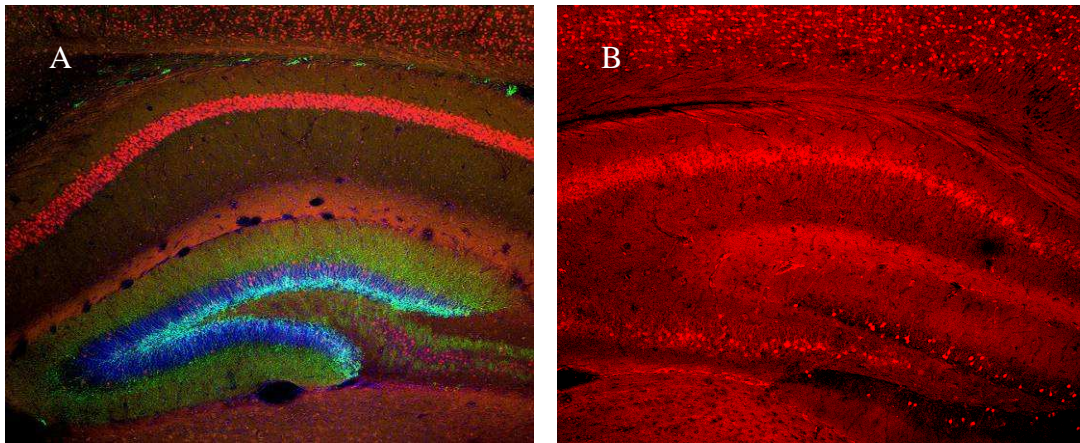
Experimentální zvířata vystavená specifické stimulaci, případně vykonávající určitou behaviorální úlohu, jsou po experimentu usmrcena, jejich mozky nařezány a zpracovány imunocytochemicky (detekce IEG proteinu) nebo s použitím *in situ* hybridizace (detekce RNA). Počet pozitivních buněk nebo úroveň exprese RNA se v rámci experimentální skupiny průměruje a porovná s tímž u kontrolních zvířat.

6.1. Imunocytochemické metody

Detekce pomocí protilátek je často používanou metodou. Metoda je to časově nenáročná a levná. Její nevýhodou je omezené časové rozlišení (~ desítky minut), což je nutné zohlednit při standardizaci experimentu.

Prvním a zásadním krokem je fixace, která zastaví všechny buněčné děje a zachová strukturu tkání. Při výběru fixace tkáně se musí skloubit protichůdné požadavky. I při zachování morfologie tkání musí zůstat antigeny funkční (tj. proteiny ITFs) a nesmí vznikart artefakty. Zastavení exprese se týká toho okamžiku, kdy se do tkání dostane fixáž. Je proto důležité celý proces uskutečnit co nejrychleji. Mozek zvířete se po fixaci nařeže na tenké řezy, které se nechají reagovat s primární protilátkou, která se váže na epitopy konkrétního IEG. Samotná vazba antigenu s protilátkou není viditelnou reakcí. Pro vizualizaci lokalizace antigenu a na něj navázaných molekul ve tkáni je nutné použít chromogen. Podle typu chromogenu rozlišujeme nejpoužívanější metody na imunofluorescenční a imunoenzymové. U imunoenzymových metod jsou protilátky nejčastěji značené konjugací s enzymy, nejčastěji s křenuvou peroxidázou, alkalickou fosfatázou nebo acetylcholinesterázou.



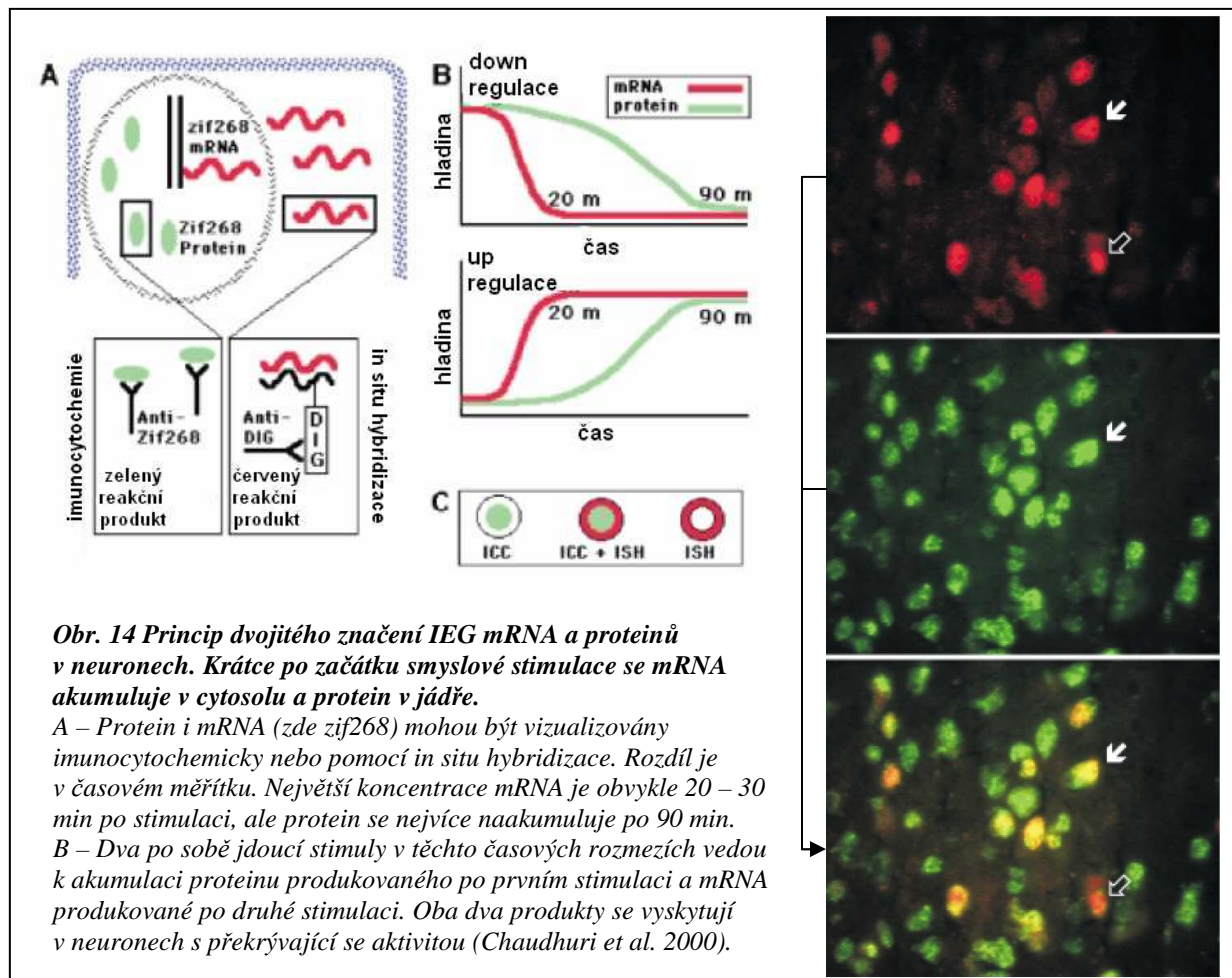


Obr. 13 Fluorescenční značení exprese *Egr-1* (červeně) v hipokampu mláděte myši (A) a zvýšené exprese *Arc* (červeně) v hipokampu po aktivitě myši (B). (<http://www.flickr.com/photos/functionalneurogenesis>)

6.2. *In situ* hybridizace a odvozené metody

Detekce mRNA je technicky obtížnější a finančně náročnější, ale její výhodou je časové rozlišení v řádu minut. Pro detekci mRNA IEGs při studiu její lokalizace se standardně používá radioaktivní nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Modifikací fluorescenční *in situ* hybridizace vznikla metoda aplikovatelná na mapování odpovědí neuronů na buněčné úrovni s časovým rozlišením – „*cellular analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization*“ nebo také **catFISH**. Principem metody je detekce primární (neupravené) RNA v jádře a upravené mRNA v cytoplasmě s použitím fluorescenční *in situ* hybridizace a konfokální mikroskopie (Guzowski et al. 1999). Tuto metodu poprvé použil Guzowski (1999) při detekci *Arc* mRNA 5 minut po stimulaci v jádrech neuronů, po 30 minutách je mRNA již detekovatelná v cytoplasmě.

Používá se rovněž tzv. **dvojitě značení aktivovaných neuronů** - „*dual activity mapping*“ (Chaudhuri et al. 1997). Dvojitě značení (Obr. 13), jak už z názvu vyplývá, je náročnější oproti catFISH hlavně kvůli dvěma histologickým procedurám. Kombinuje fluorescenční *in situ* hybridizace (detekce mRNA) s fluorescenčním imunocytochemickým značením (detekce proteinového produktu).



Obr. 14 Princip dvojitého značení IEG mRNA a proteinů v neuronech. Krátce po začátku smyslové stimulace se mRNA akumuluje v cytosolu a protein v jádře.

A – Protein i mRNA (zde zif268) mohou být vizualizovány imunocytochemicky nebo pomocí in situ hybridizace. Rozdíl je v časovém měřítku. Největší koncentrace mRNA je obvykle 20 – 30 min po stimulaci, ale protein se nejvíce naakumuluje po 90 min. B – Dva po sobě jdoucí stimuly v těchto časových rozmezích vedou k akumulaci proteinu produkovaného po prvním stimulaci a mRNA produkované po druhé stimulaci. Oba dva produkty se vyskytují v neuronech s překrývající se aktivitou (Chaudhuri et al. 2000).

7. IEGs jako nástroj pro studium prostorové orientace a paměti

IEGs mají nesporně velmi důležitou úlohu při učení. Synaptická aktivita spojená s učením navozuje vysokou míru exprese několika IEGs (Cole et al. 1989). Produkty těchto genů, transkripční faktory i efektorové IEGs, jsou důležité pro synaptickou plasticitu založenou na proteinové syntéze, nezbytnou pro upevňování paměti (Guzowski 2006). Velmi často se ve studiích zaměřených na vliv změn prostředí používá jako marker *c-Fos*. Tento IEG má poměrně nízkou bazální úroveň exprese, která může po stimulaci velice rychle stoupat (Zangenehpour and Chaudhuri 2002). Právě proto je aktivace *c-Fos* opakovaně zmiňována v souvislosti s učením (Tischmeyer and Grimm 1999; Guzowski et al. 2001; Aggleton 2005), včetně učení nových prostorových souvislostí (Vann et al. 2000).

Zvýšená exprese IEGs *Arc* a *Homer 1a* je spojována se synaptickou modifikací, tj. změnami ve struktuře neuronální sítě. Inhibice exprese *Arc* v hipokampu narušuje dlouhodobou potenciaci a dlouhodobou prostorovou paměť (Guzowski et al. 2000). Studie používající dvojitého značení fluorescenční *in situ* hybridizace („*double-label FISH*“) demonstrovali silnou indukci transkripce obou markerů, *Arc* a *H1a*, ve stejných neuronech hipokampu či neokortexu potkana (Vazdarjanova et al. 2002). Použití *Arc* se v poslední době ukazuje jako velmi výhodné díky jeho vlastnostem. *Arc* mRNA je detekovatelná v jádře již po několika minutách podobně jako *zif268*, ale na rozdíl od mRNA *zif268* je rychle transportována do dendritů (Guzowski et al. 1999).

Metodickým úskalím použitelnosti IEG ve výzkumu učení a paměti je tzv. latentní učení (Tolman 1932). Jedná se o učení během spontánní explorační chůze po vložení do experimentálního prostoru, které zvyšuje hladinu exprese IEGs (Guzowski 2006). Proto je důležité používat takové typy testů, které specificky aktivují co největší počet neuronů v konkrétní oblasti (Guzowski 2006).

Zvýšená exprese RNA *arc*, *egr-1* a *c-fos* byla zjištěna při testech prostorového učení u potkana v hipokampu, entorhinální kůře a zrakové kůře (Guzowski et al. 2001). Testy se prováděly v Morrisově vodním bludišti. Při opakovaných testech zůstávaly hladiny exprese zvýšené, nicméně byla zaznamenána sestupná tendence exprese všech tří použitých markerů. Hladina exprese *arc* byla vyšší v hipokampu a entorhinální kůře při změně polohy ostrůvku. Zároveň byla nejvyšší exprese *arc* v hipokampu u těch zvířat, která byla v testech nejúspěšnější. Výsledky tedy podporují hypotézu o důležitosti exprese IEG (a hlavně *arc*) pro vytváření dlouhodobé paměti. Tyto výsledky jsou v rozporu se staršími studiemi, která

v obdobných testu ve vodním bludišti nezaznamenala zvýšenou expresi *egr-1* (Wisden et al. 1990). Tento rozpor však pravděpodobně souvisí s vyšší citlivostí metody (*RNAse protection assay*) použité v recentní studii (Guzowski et al. 2001).

Vann a kol. (2000) demonstrovali, že míra exprese proteinu *c-Fos* v hipokampálním komplexu je závislá na obtížnosti prostorového testu. V osmiramenném radiálním bludišti byla zvýšená exprese pozorována u zvířat, která řešila standardní úlohu ve srovnání se zvířaty, která byla opakovaně vpuštěna pouze do jednoho ramene bludiště. V druhém experimentu byla vyšší exprese *c-Fos* zaznamenána u potkanů, kteří byli v klasickém testu, ale ve změněném prostředí - jiná místnost s jinými zrakovými vodítky (Vann et al. 2000).

Velmi důmyslný experiment v osmiramenném bludišti provedli Colombo a kol. (2003). Trénovali potkany v úloze, kterou lze řešit různými strategiemi – s využitím alocentrické prostorové informace („*place learning*“) nebo egocentrické informace („*response learning*“). „*Place learners*“ při vpuštění do arény z ramena protilehlého k ramenu, ze kterého byli vpuštěni během tréninku, bezchybně vyhledali odměnu v podobě potravy. „*Response learners*“ v takovém případě chybně hledali potravu v protilehlém rameni. Hladina exprese *c-fos* byla u potkanů využívající obě strategie zvýšená bezprostředně po experimentu v hipokampu i ve striatu. Jednu hodinu po experimentu však hladina *c-Fos* závisela na zvolené strategii. „*Place learners*“ měli nadále zvýšenou expresi v hipokampu, avšak exprese ve striatu se vrátila na bazální hladinu. U „*response learners*“ tomu bylo obráceně – měli zvýšenou hladinu *c-Fos* ve striatu, nikoliv v hipokampu. Paměťové stopy pro tyto odlišné strategie mají tedy odlišný neurální substrát.

Guzowski a kol. (1999) zjistili, že exprese IEGs v mozku vzroste v novém prostředí. Při přemístění zvířete do nového experimentálního prostoru došlo k expresi *Arc*. Potkani si při testování vytvářeli mapu neznámého sektoru experimentálního prostředí, po určitém intervalu byly náhodně přesunuti do dalšího neznámého sektoru. Největší aktivita byla zjištěna v oblasti CA1 hipokampu. To naznačuje, že existuje lokalizovaná aktivita určité skupiny neuronů, které se aktivují v souvislosti s porovnáváním uložených map prostředí a nových prostorových souvislostí (Guzowski et al. 2004; Guzowski 2006, Kubík et al. 2007).

Pro vznik kognitivní mapy jsou u hlodavců důležitá zraková orientační vodítka. Wan a kol. (1999) ve své studii poukazují na to, že neznámé vizuální podněty (tzv. „*cue cards*“) vedou k aktivaci (zvýšené expresi proteinu *c-Fos*) v perirhinální a inferotemporální kůře, zatímco nová prostorová kombinace známých zrakových vodítek k aktivaci hipokampu. Pro hipokampus jsou tedy relevantní stimulační prostorové vztahy spíše než zraková stimulace jako taková. Amin a kolegové (2006) v obdobném experimentu způsobili změnou kombinace

zrakových vodítek ve známém prostředí pokles exprese c-Fos v retrosplenální kůře a v oblasti CA1 dorzálního hipokampu. Exprese c-Fos v CA3, *gyrus dentatus* a ventrálním hipokampu nebyla signifikantně ovlivněna.

Zvýšená exprese *zif268* byla pozorována v amygdale a CA1 hipokampu v průběhu testů obsahujících strachovou asociaci v určitém kontextu prostředí (Hall et al. 2001).

Santin a kol. (2003) analyzovali roli mammilárních jader v testech při prostorové paměti. Při testování využití krátkodobé prostorové paměti v Morrisově vodním bludišti u potkanů prudce vzrostla exprese *c-Fos* v mediálním mammilárním jádře. V supramammilárním jádře vzrostla hladina exprese c-Fos v závislosti na typu trénování zvířete a byla nezávislá na náročnosti úlohy na pracovní či referenční paměť.

Kombinací léze a detekce výsledné pozměněné neuronální aktivity se rozšiřují hranice klasických behaviorálních fyziologických experimentů. V případě unilaterální léze entorhinálního kůry je exprese *Arc* zvýšena pouze v ipsilaterální části *gyrus dentatus*, CA3 a CA1, zatímco kontralaterální část hemisfér zůstane bez aktivní exprese *Arc* (Temple et al. 2003). U zvířat s bilaterální lézí fornixu byla exprese *Arc* potlačena ve všech třech oblastech hipokampu a zvířata nebyla schopna prostorového učení ve vodním bludišti (Fletcher et al. 2006). Jiné aktivátory exprese *Arc*, vysokofrekvenční stimulace nebo bludiště se zrakovými orientačními vodítky, indukovaly transkripci *arc* bez ohledu na poškození fornixu (Fletcher et al. 2006). Potlačená exprese c-Fos u experimentů s potkany s lézí hipokampu (Jenkins et al. 2006), anteriorního thalamického jádra (Jenkins et al. 2002) a fornixu (Vann et al. 2000) přispívá svými výsledky ke zpřesnění lokalizace neurálního substrátu navigačního okruhu.

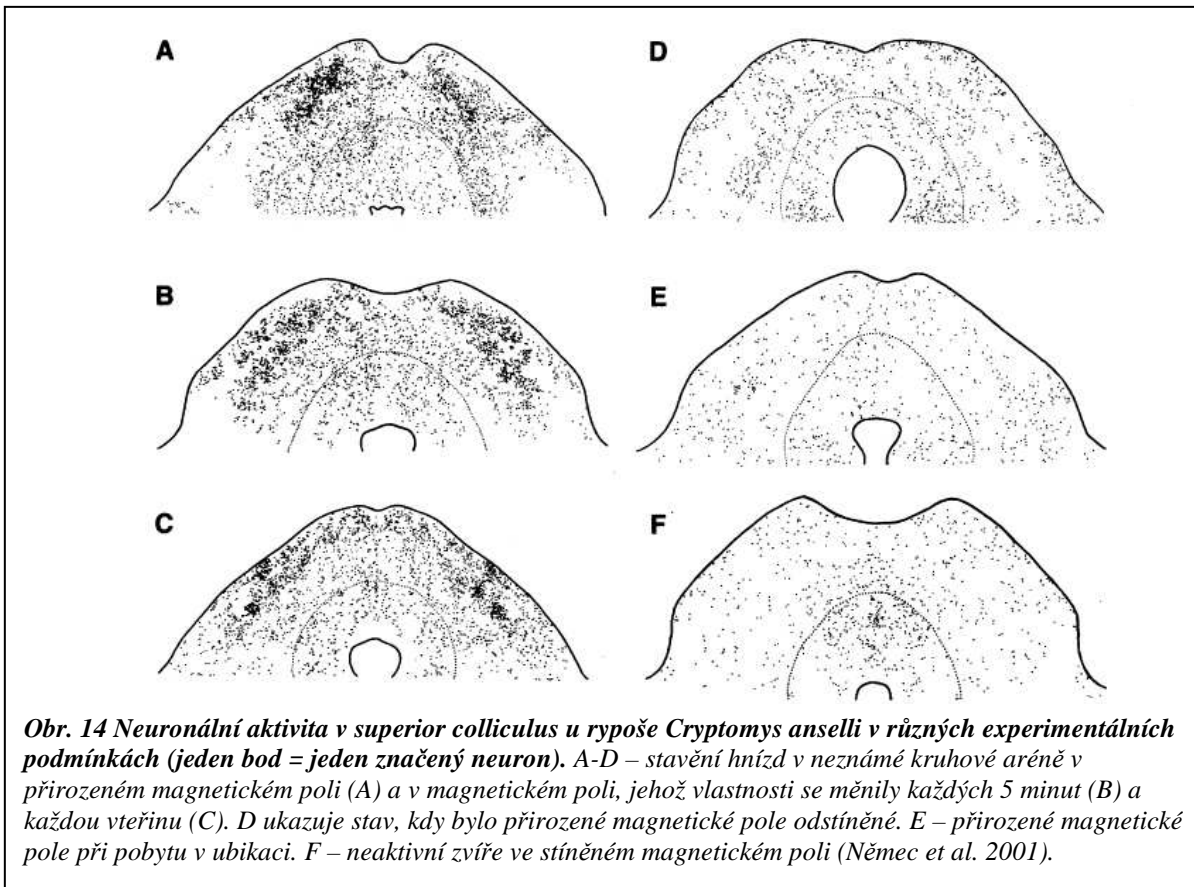
Výše zmíněné studie poukazují na rozdílnost ve funkcích různých oblastí hipokampu. Podporují svými výsledky významnost dorzálního hipokampu pro prostorové a kontextové učení a paměť (Guzowski et al. 1999; Guzowski et al. 2001). Dorzální je recipročně propojený s korovými oblastmi (neokortex). Naproti tomu ventrální hipokampus je spojený s podkorovými oblastmi, např. amygdalou a hypothalamem a uplatňuje se spíše v emočních a motivačních procesech (van Strien et al. 2009). Díky detekčním metodám využívajícím IEGs se zjistilo, že struktury zapojené v navigačním okruhu hlodavců se do procesu zpracovávání prostorové informace zapojují při různých testech v odlišné míře.

8. Vliv změn přirozeného magnetického pole na prostorovou orientaci

V této kapitole bych ráda zmínila jednu ze složek spektra informací, které živočich získává o svém okolí – vlastnosti magnetického pole Země. Tuto aplikaci testů prostorové orientace a paměti zde zmiňuji proto, že se chci ve své diplomové práci zaměřit na vliv změn přirozeného magnetického pole na chování a prostorovou orientaci myši inbredního kmene C57BL/6J. Pro detekci aktivovaných mozkových oblastí by byly použity výše zmíněné IEGs. Získaná data porovná s výsledky z předchozích magnetorecepčních experimentů prováděných na dalších modelových obratlovcích.

Design testů magnetorecepčních schopností je odvozený od testů prostorové orientace a paměti a je přizpůsobený konkrétnímu studovanému druhu živočicha. Nejpoužívanějšími experimentálními paradigmatem je aktivní magnetická orientace v prostředí, které neobsahuje jiná orientační vodítka za různých magnetických podmínek (např. v přirozeném, proměnlivém nebo odstíněném magnetickém poli).

Neznámý mechanismus prostorové orientace pomocí kompasového smyslu se zaměřením na magnetorecepci se studoval pomocí IEGs nejdříve u ptáků kvůli migračnímu chování. Studie využívající jako markery ITFs přinesly výsledky, které vypovídají o možném zapojení thalamofugálního zrakového systému (Mouritsen and Ritz 2005; Liedvogel et al. 2007) a hipokampu (Shimizu et al. 2004) do zpracovávání informací o magnetickém poli. Již z dřívějších studií bylo zřejmé, že funkce magnetického kompasu u ptáků je závislá na intenzitě světla (Deutschlander et al. 1999; Wiltschko and Wiltschko 2005). Kromě toho je ptačí magnetický kompas ovlivnitelný krátkovlnnými radiofrekvencemi (Ritz et al. 2004). V případě hlodavců jsou dnes experimenty zaměřeny na rozdílnost mechanismů magnetické orientace zvířat žijících v typově odlišných prostředích (subteránní, epigeičtí hlodavci) a v různých sociálních uspořádáních (skupiny, jednotlivci). Magnetická informace je součástí vstupních informací o okolním prostředí, tudíž lze předpokládat, že bude zpracovávána společně s ostatními navigačními daty v navigačním systému (Burger et al. 2010). Jako první použil kombinaci behaviorální studie a imunocytochemické vizualizace Němec a kolegové (2001), konkrétně u rysoše *Cryptomys anelli* (Bathyergidae). Díky aktivnímu markeru *c-Fos* zjistili, že magnetoresponzivní neurony se vyskytují v *superior colliculus*. Využili přitom vliv několika faktorů ovlivňujících neurální aktivitu při běžných aktivitách zvířat – např. neznámé prostředí či změnu magnetického pole (Obr. 14).



Podobné studie zaměřené na hlodavce přinesly přesvědčivé výsledky o používání magnetické informace u dvou zástupců subteránních hlodavců *Fucomys anselli* a *Spalax ehrenbergi* čeledi Bathyergidae a zástupce epigeických hlodavců křečička džungarského (*Phodopus sungorus*) z čeledi Muridae. *Fucomys anselli* a *Spalax ehrenbergi* projevují instinktivní tendenci stavět hnízda východním až jihovýchodním směrem. Pokud se experimentálně změnil směr horizontálního vektoru magnetického pole, změnila se i poloha hnízd (Burda et al. 1990; Kimchi and Terkel 2001). Zároveň jedinci *S. ehrenbergi* aplikovali magnetickou informaci na aktivity spojené s organizací obývaného prostředí, např. uložení potravy nebo defekační místa. Magnetickou informaci používali i v testech prostorové orientace a integrace dráhy v bludištích (Kimchi and Terkel 2001). Na rozdíl od rypošť křečičk džungarský projevoval slabší tendenci aplikovat změnu magnetického pole na své aktivity a jeho odpovědi na experimentální podmínky nabývaly spíše bimodálního charakteru (Deutschlander et al. 2003). Další zvířetem, které se ukázalo jako perspektivní modelový organismus pro výzkum prostorové a magnetické orientace, je inbrední kmen myši C57BL/6J. Jeho výsledné reakce a schopnosti absolvovat úlohy v modifikovaném Morrisově vodním bludišti jsou natolik dobré (Gerlai 2002), že se pravděpodobně bude využívat v dalších

studiích včetně knockoutované varianty bez funkčního kryptochromu, důležitého pro funkční magnetickou orientaci (Ritz et al. 2000). V několika experimentech se již tento inbrední kmen použil v souvislosti s magnetorecepcí. Pokud se horizontální vektor magnetického pole blížil naučenému stavu magnetického pole, stavěly myši svá hnízda signifikantně podle magnetického vektoru, tj. podobně jako rypoši se stálou jižní nebo jihovýchodní preferencí. To ukazuje na evidentně funkční magnetický kompas, který zvířata používají s velkou přesností (Muheim et al. 2006). O magnetické orientaci u myši se téměř nic neví. Podle fylogenetické příbuznosti by měla mít mechanismus magnetického kompasu shodný s rypošem, tj. permanentně magnetický materiál – biogenní magnetit (Marhold et al. 1997). Zajímavým tématem pro výzkum v této oblasti je použití magnetické informace i v jiných případech než k orientaci hnízd, například v souvislosti s navigací v bludišti nebo integrací dráhy.

9. Závěr

Použití genů časné odpovědi jako markerů neuronální aktivace vedlo k významnému pokroku na poli výzkumu neurálního substrátu prostorové orientace. Zavedení moderních detekčních metod (např. catFISH) a použití nových efektorových IEGs (např. *Arc* a *Homer 1a*) vedlo k výraznému pokroku při studiu synaptické plasticity spjaté s učením. Různé behaviorální testy spojené s následnou detekcí IEGs přinesly nové poznatky o zapojení jednotlivých mozkových center do specifických úloh. Nejvíce prozkoumanou oblastí je hipokampální komplex, který je považován za oblast nejčastěji zapojenou do zpracovávání informací potřebných pro konstrukce kognitivních map. Ukazuje se však, že funkcí hipokampu je mnohem více (např. role ventrálního hipokampu v emočních a motivačních procesech). Spolu s elektrofyziologickými a projekčními studii přispěli výzkumy využívající IEGs velkou měrou k vytvoření modelu navigačního systému hlodavců. Použití IEGs také výrazně přispělo k popisu neurálního substrátu magnetické orientace. Přes vysoké nároky na standardizaci používaných testů i detekčních metod jsou tedy IEGs perspektivním nástrojem pro studium prostorové orientace.

10. Použitá literatura

Aggleton, J. P. (2005). "Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging." Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B-Comparative and Physiological Psychology **58**(3-4): 218-233.

Aggleton, J. P. and J. M. Pearce (2001). "Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **356**(1413): 1467-1482.

Amaral, D. G. and M. P. Witter (1995). Hippocampal formation. In The Rat Nervous System. Second edition. London, Academic Press; 1995: 443-493.

Amin, E., J. M. Pearce, et al. (2006). "Novel temporal configurations of stimuli produce discrete changes in immediate-early gene expression in the rat hippocampus." European Journal of Neuroscience **24**(9): 2611-2621.

Bennett, A. T. D. (1996). "Do animals have cognitive maps?" Journal of Experimental Biology **199**(1): 219-224.

Blair, H. T., J. W. Cho, et al. (1998). "Role of the lateral mammillary nucleus in the rat head direction circuit: A combined single unit recording and lesion study." Neuron **21**(6): 1387-1397.

Boccaro, C. N., F. Sargolini, et al. (2010). "Grid cells in pre- and parasubiculum." Nature Neuroscience **13**(8): 987-U112.

Brun, V. H., T. Solstad, et al. (2008). "Progressive Increase in Grid Scale From Dorsal to Ventral Medial Entorhinal Cortex." Hippocampus **18**(12): 1200-1212.

Burda, H., V. Bruns, et al. (1990). Sensory adaptations in subterranean mammals. Symposium at the 5th international theriological congress: Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels. E. Nevo, O. A. Reig. New York, Wiley-Liss, Inc. **335**: 269-293.

Burger, T., M. Lucova, et al. (2010). "Changing and shielded magnetic fields suppress c-Fos expression in the navigation circuit: input from the magnetosensory system contributes to the internal representation of space in a subterranean rodent." Journal of the Royal Society Interface **7**(50): 1275-1292.

Burgess, N., A. Jackson, et al. (2000). "Predictions derived from modelling the hippocampal role in navigation." Biological Cybernetics **83**(3): 301-312.

Burwell, R. D., M. P. Witter, et al. (1995). "Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: A review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain." Hippocampus **5**(5): 390-408.

- Cole, A. J., D. W. Saffen, et al. (1989).** "Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation." Nature **340**(6233): 474-476.
- Colombo, P. J., J. J. Brightwell, et al. (2003).** "Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum." Journal of Neuroscience **23**(8): 3547-3554.
- D'Hooge, R. and P. P. De Deyn (2001).** "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory." Brain Research Reviews **36**(1): 60-90.
- Deutschlander, M. E., S. C. Borland, et al. (1999).** "Extraocular magnetic compass in newts." Nature **400**(6742): 324-325.
- Deutschlander, M. E., M. J. Freake, et al. (2003).** "Learned magnetic compass orientation by the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*." Animal Behaviour **65**: 779-786.
- Downs, R. M., D. Stea. (1973).** Cognitive maps and spatial behavior: Process and products. Image and Environment: Cognitive Mapping and Spatial Behavior. R. M. Downs, D. Stea. Chicago, Aldine Publishing: 8-26.
- Dudchenko, P. A. (2003).** The head direction system and navigation. The neurobiology of spatial behaviour. K. J. Jeffery. New York, Oxford University Press: 173 - 186.
- Dudchenko, P. A. and J. S. Taube (1997).** "Correlation between head direction cell activity and spatial behavior on a radial arm maze." Behavioral Neuroscience **111**(1): 3-19.
- Farivar, R., S. Zangenehpour, et al. (2004).** "Cellular-resolution activity mapping of the brain using immediate-early gene expression." Frontiers in Bioscience **9**: 104-109.
- Ferbinteanu, J. and M. L. Shapiro (2003).** "Prospective and retrospective memory coding in the hippocampus." Neuron **40**(6): 1227-1239.
- Fletcher, B. R., M. E. Calhoun, et al. (2006).** "Fornix lesions decouple the induction of hippocampal arc transcription from behavior but not plasticity." Journal of Neuroscience **26**(5): 1507-1515.
- Fyhn, M., S. Molden, et al. (2004).** "Spatial representation in the entorhinal cortex." Science **305**(5688): 1258-1264.
- Gallistel, C. R. (1989).** "Animal cognition - the representation of space, time and number." Annual Review of Psychology **40**: 155-189.
- Gerlai, R. (2002).** "Hippocampal LTP and memory in mouse strains: Is there evidence for a causal relationship?" Hippocampus **12**(5): 657-666.
- Guzowski, J. F. (2006).** Immediate early genes and the mapping of environmental representations in hippocampal neural networks. Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders: 159-176.

- Guzowski, J. F., J. J. Knierim, et al. (2004).** "Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1." Neuron **44**(4): 581-584.
- Guzowski, J. F., G. L. Lyford, et al. (2000).** "Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory." Journal of Neuroscience **20**(11): 3993-4001.
- Guzowski, J. F., B. Setlow, et al. (2001).** "Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268." Journal of Neuroscience **21**(14): 5089-5098.
- Guzowski, J. F., B. L. McNaughton, et al. (1999).** "Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles." Nature Neuroscience **2**(12): 1120-1124.
- Hafting, T., M. Fyhn, et al. (2005).** "Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex." Nature **436**(7052): 801-806.
- Hall, J., K. L. Thomas, et al. (2001).** "Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: Selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories." Journal of Neuroscience **21**(6): 2186-2193.
- Herdegen, T. (1996).** "Jun, Fos, and CREB/ATF transcription factors in the brain: Control of gene expression under normal and pathophysiological conditions." Neuroscientist **2**(3): 153-161.
- Herdegen, T. and J. D. Leah (1998).** "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins." Brain Research Reviews **28**(3): 370-490.
- Herrera, D. G. and H. A. Robertson (1996).** "Activation of c-fos in the brain." Progress in Neurobiology **50**(2-3): 83-107.
- Chaudhuri, A., J. Nissanov, et al. (1997).** "Dual activity maps in primate visual cortex produced by different temporal patterns of zif268 mRNA and protein expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(6): 2671-2675.
- Chaudhuri, A., S. Zangenehpour, et al. (2000).** "Molecular maps of neural activity and quiescence." Acta Neurobiologiae Experimentalis **60**(3): 403-410.
- Chen, L. L., L. H. Lin, et al. (1994).** "Head direction cells in the rat posterior cortex: I. Anatomical distribution and behavioral modulation." Experimental Brain Research **101**(1): 8-23.
- Jeffery, K. J. and N. Burgess (2006).** "A metric for the cognitive map: found at last?" Trends in Cognitive Sciences **10**(1): 1-3.

- Jenkins, T. A., E. Amin, et al. (2006).** "Changes in immediate early gene expression in the rat brain after unilateral lesions of the hippocampus." Neuroscience **137**(3): 747-759.
- Jenkins, T. A., R. Dias, et al. (2002).** "Changes in Fos expression in the rat brain after unilateral lesions of the anterior thalamic nuclei." European Journal of Neuroscience **16**(8): 1425-1432.
- Kaczmarek, L. and A. Chaudhuri (1997).** "Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: Implications for functional mapping and neural plasticity." Brain Research Reviews **23**(3): 237-256.
- Kimchi, T. and J. Terkel (2001).** "Magnetic compass orientation in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi*." Journal of Experimental Biology **204**(4): 751-758.
- Kubik, S., T. Miyashita, et al. (2007).** "Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions." Learning & Memory **14**(11): 758-770.
- Leutgeb, S., J. K. Letugeb, et al. (2005).** "Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles." Science **309**(5734): 619-623.
- Liedvogel, M., K. Maeda, et al. (2007).** "Chemical Magnetoreception: Bird Cryptochrome 1a Is Excited by Blue Light and Forms Long-Lived Radical-Pairs." Plos One **2**(10).
- Long, K. D. and J. M. Salbaum (1998).** "Evolutionary conservation of the immediate-early gene ZENK." Molecular Biology and Evolution **15**(3): 284-292.
- Lyford, G. L., K. Yamagata, et al. (1995).** "*Arc*, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites." Neuron **14**(2): 433-445.
- Marhold, S., W. Wiltschko, et al. (1997).** "A magnetic polarity compass for direction finding in a subterranean mammal." Naturwissenschaften **84**(9): 421-423.
- Mizumori, S. J. Y., B. G. Cooper, et al. (2000).** "A neural systems analysis of adaptive navigation." Molecular Neurobiology **21**(1-2): 57-82.
- Mizumori, S. J. Y. and J. D. Williams (1993).** "Directionally mnemonic properties of neurons in lateral dorsal nucleus of the thalamus of rats." Journal of Neuroscience **13**(9): 4015-4028.
- Moita, M. A. P., S. Rosis, et al. (2003).** "Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning." Neuron **37**(3): 485-497.
- Morris, R. (1984).** "Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat." Journal of Neuroscience Methods **11**(1): 47-60. ex
- Morris, R. G. M., F. Schenk, et al. (1990).** "Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning." European Journal of Neuroscience **2**(12): 1016-1028.

Morris, R. G. M. (2001). "Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **356**(1413): 1453-1465.

Moser, E. I., E. Kropff, et al. (2008). "Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system." Annual Review of Neuroscience **31**: 69-89.

Mouritsen, H. and T. Ritz (2005). "Magnetoreception and its use in bird navigation." Current Opinion in Neurobiology **15**(4): 406-414.

Muheim, R., N. Edgar, et al. (2006). "Magnetic compass orientation in C57BL/6J mice." Learning & Behavior **34**(4): 366-373.

Muller R.U., J. L. Kubie et al. (1991). Spatial firing correlates of neurons in the hippocampal formation of freely moving rats. Brain and space. J. Paillard. New York, Oxford University Press: 296–333.

Muller, R. U. (2002). Sensory determinants of hippocampal place cell firing field. The neural basis of navigation. F. R. Sharp. Massachusetts, Kluwer academic publishers.

Némec, P., J. Altmann, et al. (2001). "Neuroanatomy of magnetoreception: The superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal." Science **294**(5541): 366-368.

O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "Hippocampus as a spatial map - preliminary evidence from unit activity in freely-moving rat. " Brain Research **34**(1): 171-175.

O'Keefe, J. and D. H. Conway (1978). "Hippocampal place units in freely moving rat - why they fire where they fire." Experimental Brain Research **31**(4): 573-590.

O'Keefe, J. and L. Nadel (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford, Oxford University Press.

Paxinos, G. and C. Watson (2005). The rat brain in stereotaxic coordinates. London, Elsevier.

Olton, D. S. and M. A. Werz (1978). "Hippocampal function and behavior-spatial discrimination and response inhibition." Physiology & Behavior **20**(5): 597-605.

Ranck, J. B. (1984). "Head direction cells in the deep cell layers of dorsal presubiculum in freely moving rats." Society for Neuroscience Abstracts **12**:1524.

Redish, A. D., F. P. Battaglia, et al. (2001). "Independence of firing correlates of anatomically proximate hippocampal pyramidal cells." Journal of Neuroscience **21**(5).

Ritz, T., S. Adem, et al. (2000). "A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds." Biophysical Journal **78**(2): 707-718.

Ritz, T., P. Thalau, et al. (2004). "Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass." Nature **429** (6988): 177-180.

- Santin, L. J., J. A. Aguirre, et al. (2003).** "c-Fos expression in supramammillary and medial mammillary nuclei following spatial reference and working memory tasks." Physiology & Behavior **78**(4-5): 733-739.
- Sharp, P. E. (2002).** Subicular place cells show similar firing fields across different environments: Comparison with hippocampal place cells. The neural basis of navigation. P. E. Sharp. Massachusetts, Kluwer Academic Publishers **9**: 117-139.
- Sharp, P. E., H. T. Blair, et al. (2001).** "The anatomical and computational basis of the rat head-direction cell signal." Trends in Neurosciences **24**(5): 289-294.
- Shimizu, T., A. N. Bowers, et al. (2004).** "What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? Selective examination of ZENK expression." Behavioral Neuroscience **118**(4): 845-851.
- Sinnamon, H. M., S. Freniere, et al. (1978).** "Rat hippocampus and memory for places of changing significance." Journal of Comparative and Physiological Psychology **92**(1): 142-155.
- Solstad, T., C. N. Boccara, et al. (2008).** "Representation of geometric borders in the entorhinal cortex." Science **322**(5909): 1865-1868.
- Stackman, R. W. and J. S. Taube (1998).** "Firing properties of rat lateral mammillary single units: Head direction, head pitch, and angular head velocity." Journal of Neuroscience **18**(21): 9020-9037.
- Steward, O., C. S. Wallace, et al. (1998).** "Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localise selectively near activated postsynaptic sites on dendrites." Neuron **21**(4): 741-751.
- van Strien, N. M., N. L. M. Cappaert, et al. (2009).** "The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network." Nature Reviews Neuroscience **10**(4): 272-282.
- Taube, J. S. (1995).** "Head direction cells recorded in the anterior thalamic nuclei of freely moving rats." Journal of Neuroscience **15**(1): 70-86.
- Taube, J. S. (2002).** Sensory determinants of head direction cell activity. The neural basis of navigation: Evidence from single cell recording. F. R. Sharp. Massachusetts, Kluwer Academic publishers **8**: 141-161.
- Taube, J. S. (2007).** "The head direction signal: Origins and sensory-motor integration." Annual Review of Neuroscience **30**: 181-207.
- Taube, J. S., R. U. Muller, et al. (1990).** "Head direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats: I. Description and quantitative analysis." Journal of Neuroscience **10**(2): 420-435.

Temple, M. D., P. F. Worley, et al. (2003). "Visualizing changes in circuit activity resulting from denervation and reinnervation using immediate early gene expression." Journal of Neuroscience **23**(7): 2779-2788.

Thinus-Blanc, C. (1988). Animal spatial cognition. Thought without Language. L. Weiskrantz. Oxford, Oxford University Press: 371–395.

Tischmeyer, W. and R. Grimm (1999). "Activation of immediate early genes and memory formation." Cellular and Molecular Life Sciences **55**(4): 564-574.

Tolman, E. C. (1930). "Maze performance a function of motivation and of reward as well as of knowledge of the maze paths." Journal of General Psychology **4**(1-4): 338-342.

Tolman, E. C. (1932). Purposive behavior in animals and men. New York, Century.

Tolman, E. C. (1948). "Cognitive maps in the rats and men." Psychological Review **55**(4): 189-208.

Touretzky, D. S. (2002). The rodent navigation circuit. The neural basis of navigation: Evidence from single cell recording. P. E. Sharp. London, Kluwer Academic Publishers 12: 217-233.

Vann, S. D., M. W. Brown, et al. (2000). "Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests." Journal of Neuroscience **20**(7): 2711-2718.

Vazdarjanova, A., B. L. McNaughton, et al. (2002). "Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes Arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks." Journal of Neuroscience **22**(23): 10067-10071.

Wan, H. M., J. P. Aggleton, et al. (1999). "Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory." Journal of Neuroscience **19**(3): 1142-1148.

Whitlock, J. R., R. J. Sutherland, et al. (2008). "Navigating from hippocampus to parietal cortex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(39): 14755-14762.

Wiener, S. I. (1993). "Spatial and behavioral correlates of striatal neurons in rats performing a self-initiated navigation task." Journal of Neuroscience **13**(9): 3802-3817.

Wiltschko, W. and R. Wiltschko (2005). "Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals." Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology **191**(8): 675-693.

Wilson, M. A. and B. L. McNaughton (1993). "Dynamics of the hippocampal ensemble code for space." Science **261**(5124): 1055-1058.

Wisden, W., M. L. Errington, et al. (1990). "Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord." Neuron **4**(4): 603-614.

Witter, M. P. and D. G. Amaral (2004). Cortex: Hippocampal formation. The rat nervous system. G. Paxinos. London, Elsevier: 637 – 687.

Witter, M. P. and E. I. Moser (2006). "Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex." Trends in Neurosciences **29**(12): 671-678.

Wood, E. R., P. A. Dudchenko, et al. (2000). "Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location." Neuron **27**(3): 623-633.

Zangenehpour, S. and A. Chaudhuri (2002). "Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps." Molecular Brain Research **109**(1-2): 221-225.