

## Nie-neuronalne mechanizmy poznawcze i pamięć prostych eukariontów Mechanisms of non-neural cognition and molecular memory of *Physarum polycephalum*

### Czego dotyczy projekt?

Celem niniejszego projektu jest próba zbliżenia się do odpowiedzi na pytanie: w jaki sposób organizmy nie posiadające układu nerwowego ani hormonalnego mogą przechowywać informacje o stanach środowiska zewnętrznego, czyli **pamiętać**, i wykorzystywać wcześniejsze doświadczenia do zmiany przyszłych zachowań, czyli **uczyć się**?

W badaniach wykorzystamy hodowlę śluzowca *Physarum polycephalum*. Jego ciało, czyli śluznia, jest widocznym gołym okiem komórczakiem, utworzonym przez fuzję wielu ameboidalnych komórek. Śluznia może się poruszać, aktywnie eksplorując środowisko w poszukiwaniu pokarmu – bakterii – a także oddalając się od miejsc potencjalnie niebezpiecznych (suchych, zawierających repelent chemiczny lub narażonych na działanie światła, które zwiększa prawdopodobieństwo powstania w cytoplazmie zabójczych dla śluzowca wolnych rodników). W związku z łatwością prowadzenia hodowli, dużymi rozmiarami i dynamiczną migracją (z szybkością rzędu 1 mm/s), a także zaskakującym repertuarem mechanizmów poznawczych (np. zdolnością odnajdywania najkrótszej drogi przez labirynt lub optymalnej sieci połączeń między miejscami zasobnymi w pokarm<sup>1-3</sup>) organizm ten jest modelem w badaniu cytoszkieletu, synchronizacji cyklu komórkowego (tysiące jego jąder komórkowych dzielą się co ok. 9 godzin), samoorganizacji oraz behawioru organizmów nie posiadających układu nerwowego.

Skupimy się na rozwinięciu naszych badań wstępnych dotyczących **habituacji**<sup>4</sup> – procesu poznawczego polegającego na stopniowym osłabieniu, a nawet zaniku, reakcji na powtarzający się bodziec – i jej wpływu na tworzącą się w śluzni pamięć metaboliczną. Proste doświadczenia posłużą za bazę dla matematycznego modelu pamięci, opartego o formalizm biologii systemów. Choć zakres niniejszego projektu nie obejmuje identyfikacji białek i genów leżących u podstaw tego mechanizmu (tym chcielibyśmy się zająć w granie, o który planujemy wystąpić po wykonaniu opisanych tu badań), zebrane wyniki dostarczą informacji o jego ogólnych cechach, w szczególności o typie regulacji, umożliwiającej tworzenie i przechowywanie informacji o stanach środowiska zewnętrznego.

Ważnym wątkiem niniejszego projektu będzie próba ilościowego wyrażenia kosztu metabolicznego, związanego z habituacją. Każdy organizm żywy musi przede wszystkim ciągle optymalizować zachodzące w nim procesy. Przeznaczenie zbyt wiele energii i surowców na utrzymanie wysokiego stężenia białek, co odzwierciedla pamięć o napotkanym przez organizm repelencie, który jednak nie okazał się letalny, może przełożyć się na lepsze przystosowanie do

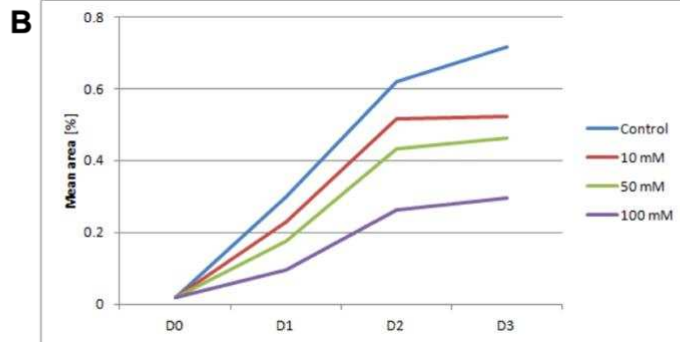
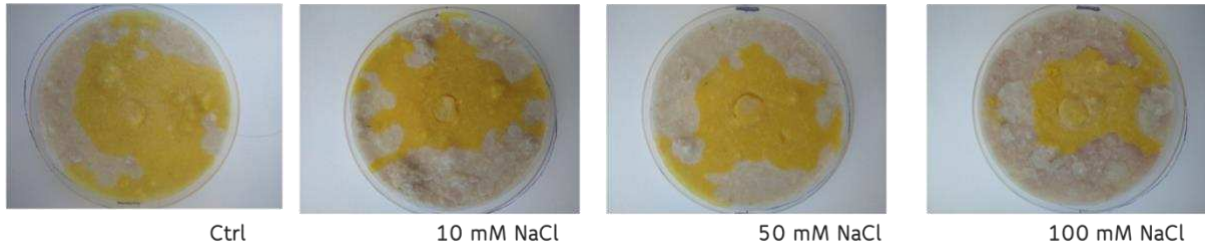
otoczenia – ale tylko wtedy, jeśli pozwoli ona żerować i rosnąć w otoczeniu tej substancji. Jeśli jej zabraknie, pamięć nie będzie miała wartości adaptacyjnej. Może wręcz zmniejszyć szanse danej śluzni na przetrwanie. Dzięki doświadczeniom grupy prof. Kaweckiego<sup>5</sup> wiemy, że muszki owocowe, które nauczono rozpoznawać więcej zapachów, w sytuacji głodu umierały wcześniej niż te, które rozpoznawały ich mniej. Pamięć kosztuje – a w skali biologicznej ostateczną walutą jest  $k_B T$ , czyli energia.<sup>6</sup>

## Co chcemy zrobić?

Działający w ramach Studenckiego Koła Naukowego Biofizyki Medycznej studenci Wydziału Lekarskiego UJ CM, we współpracy z Garażem Złożoności Instytutu Fizyki UJ wykonali pod moją opieką doświadczenia, których wyniki wskazują na zasadność postawionego problemu.

Z doniesień literaturowych wiedzieliśmy, że śluzowiec wystawiony na działanie repelentu – na przykład NaCl, chininy lub kofeiny – z czasem przestaje unikać domieszkowanego nim agaru. Śluznie poddane habituacji przekraczają agarowe mosty, dzielące je od źródła pokarmu, znacznie szybciej, niż śluznie nie poddane habituacji.<sup>4</sup> Jest to przesłanka za istnieniem pamięci.

Postanowiliśmy oszacować koszt energetyczny, jaki *Physarum polycephalum* ponosi, przyzwyczajając się do danego repelentu. W tym celu prowadziliśmy hodowlę śluzni na agarze, zawierającym stałą masę płatków owsianych, na których rozwijają się bakterie, stanowiące pokarm śluzowca (tzw. nutrient agar). Pięć szalek tworzyło kontrolę, a trzy kolejne grupy (po 5 szalek każda) hodowano na agarze z różną zawartością NaCl. Co 24 godziny wykonywano zdjęcia wszystkich śluzni, a następnie analizowano obraz cyfrowo, znajdując procentowe pokrycie szalki przez *Physarum polycephalum* (Rys. 1). Już po pierwszej dobie stwierdzono znaczące i statystycznie istotne różnice między kontrolą i każdą z grup: kontrola rosła zdecydowanie najszybciej, a pokrycie szalki przez rozwijające się organizmy malało wraz z rosnącym stężeniem soli. Różnice utrzymywały się przez następne dni, a ok. czwartej doby śluznie osiągnęły maksymalne w danych warunkach pokrycie i wzrost spowolnił (kontrola) lub całkowicie ustał (pozostałe grupy). Ponadto habituowane śluznie szybciej przekraczały agarowe mosty, dzielące je od pokarmu – choć zakażenie grzybicze hodowli nie pozwoliło opisać różnic ilościowo i powiązać ich ze stężeniem repelentu, którym prowadzono przyzwyczajanie. Wyniki te są przesłanką do stwierdzenia (choć oczywiście nie są rozstrzygającym dowodem), że wytworzenie pamięci pociąga za sobą istotny koszt nakład energetyczny, który wpływa na tempo innych procesów fizjologicznych.

**A**

*Rysunek 1* Zdjęcia przykładowych śluzni wykorzystanych w opisywanym eksperymencie, hodowanych na agarze odżywczym (Ctrl – kontrola) i z dodatkiem różnych stężeń NaCl (A). Wykresy przedstawiają zmianę procentowego pokrycia szalki Petriego przez śluznie. Widać wyraźne różnice pomiędzy kontrolą a grupami hodowanymi w rosnącym stężeniu soli. Różnice w obrębie grup nie przekraczały 3%.

Dzięki uzyskanemu w ramach niniejszego konkursu wsparciu chcielibyśmy:

1. Powtórzyć eksperyment, automatyzując proces zbierania danych i zagęszczając punkty czasowe (a także chroniąc hodowle przed zakażeniem i nadmierną ekspozycją na bodźce towarzyszące dotychczasowym pomiarom, np. światło widzialne) i powiększając liczebność poszczególnych grup.
2. Wykonać analogiczny eksperyment z użyciem innych repelentów (kofeiny, chininy) oraz ich mieszanin (problem swoistości pamięci).
3. Zbadać jakościowe i ilościowe różnice w czasie potrzebnym do odnalezienia pokarmu w środowisku zawierającym pojedyncze repelenty, do którego uprzednio przyzwyczajono śluznie, lub ich mieszaniny.
4. Ustalić związek między wartością przystosowawczą habituacji (skróceniem czasu potrzebnego na dotarcie do pokarmu) ze stężeniem repelentu, którego użyto w trakcie tego procesu – czy istnieje jakaś progowa wartość stężenia użytego podczas przyzwyczajania, powyżej której nie obserwuje się istotnego skrócenia czasu odpowiedzi na bodziec zewnętrzny o określonej sile (tzn. stężeniu większym, mniejszym lub równym bodźcowi warunkującemu)? To pytanie pozwoli wnikać w zagadnienie pojemności pamięci śluzowca.
5. Wyznaczyć czas odpowiedzi śluzni na pojawienie się repelentu oraz podjąć próbę określenia funkcji odpowiedzi układu (response function, zwykle przybliżana funkcją Hilla) odpowiedzialnego za wykorzystanie zmagazynowanej w formie pamięci molekularnej informacji o wyniku habituacji w oparciu o dynamikę chemotaksji śluzni.

6. Przeprowadzić obserwacje mikroskopowe służni poddanych i niepoddanych habituacji, żeby poszukać różnic w dynamice i morfologii ich cytoplazmy i cytoszkieletu.
7. Wykorzystać dane do przygotowania wstępnego modelu regulacji metabolizmu, opartego na nie-neuronalnej pamięci, wytworzonej w trakcie habituacji.

### Dlaczego to jest ważne?

Uczenie się, czyli zdolność do zmiany zachowania pod wpływem doświadczeń, zwykle postrzegane jest jako osiągnięcie ewolucyjne zwierząt wyższych, ewentualnie cecha komputerów. Jednak nawet najprostsze układy biologiczne – bakterie i jednokomórkowe eukarionty – dysponują fizjologicznymi mechanizmami odbierania, przetwarzania, analizy i magazynowania informacji, docierających z otoczenia, a także wskazujących na stan środowiska wewnętrznego. Zdolność dostosowania do nagłych zmian i zachowania homeostazy w warunkach dalekich od równowagi termodynamicznej wymaga zaangażowania wyspecjalizowanych szlaków metabolicznych, sieci sygnalizacyjnych i transkrypcyjnych, regulujących ekspresję genów i optymalizujących wykorzystanie energii i surowców. Istnieje wiele powtarzających się w różnych organizmach tzw. motywów sieciowych<sup>7</sup>, czyli zależności regulacyjnych między np. czynnikami transkrypcyjnymi i konkretnymi genami, których funkcją jest magazynowanie informacji o docierających do komórki bodźcach, czyli tworzenie pamięci. Jednym z prostszych przykładów jest pętla z dodatnią autoregulacją (positive autoregulation loop, PAR), w której produkowany czynnik transkrypcyjny wzmacnia ekspresję genu kodującego informację o nim samym, a więc zwiększa swoją produkcję. Może to prowadzić do utrzymania stężenia danego białka na określonym poziomie na długo po tym, jak uruchamiający jego produkcję sygnał – np. obecność danego rodzaju pożywienia w otoczeniu lub sygnał do różnicowania w dany typ komórek w toku rozwoju embrionalnego – a więc do wytworzenia **pamięci długotrwałej**. Inny motyw sieciowy, realizujący tzw. sterowanie wyprzedzające (feedforward loop, FFL), umożliwia budowanie **krótkotrwałej pamięci przejściowej**, która umożliwia np. dwóm haploidalnym komórkom drożdży przyspieszenie koniugacji, o ile wcześniej doświadczyły one obecności chemicznego sygnału aktywującego ten proces.<sup>8</sup>

Formalizm ten wydaje się być odpowiednim narzędziem do opisanie wyników doświadczeń, które zamierzamy przeprowadzić, na razie na ogólnym poziomie, wykorzystującym informacje o skalach czasowych i związkach między siłą bodźca a odpowiedzią (tzw. dose-response relations).

Wierzimy, że podjęcie próby zrozumienia molekularnych podstaw pamięci w prostych organizmach, wsparte propozycjami innych grup<sup>9</sup>, pozwoli na lepsze zrozumienie procesów istotnych dla organizmów wyższych – na przykład pamięci metabolicznej i jej związku z cukrzycą.

## Poglądowa bibliografia:

1. Alim K, Andrew N, Pringle A. Physarum. *Curr Biol.* 2013;23(24):1082–1083. doi:10.1016/j.cub.2013.09.040
2. Oettmeier C, Brix K, Döbereiner HG. Physarum polycephalum – A new take on a classic model system. *J Phys D Appl Phys.* 2017;50(41). doi:10.1088/1361-6463/aa8699
3. Nakagaki T, Yamada H, Toth A. Maze-solving by an amoeboid organism. *Nature.* 2000;407(September):2000.
4. Boisseau RP, Vogel D, Dussutour A. Habituation in non-neural organisms: Evidence from slime moulds. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2016. doi:10.1098/rspb.2016.0446
5. Mery F, Kawecki TJ. A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science (80 ).* 2005. doi:10.1126/science.1111331
6. Mahmoudabadi G, Milo R, Phillips R. Energetic cost of building a virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017. doi:10.1073/pnas.1701670114
7. Alon U. Network motifs: Theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet.* 2007. doi:10.1038/nrg2102
8. Doncic A, Skotheim JM. Feedforward Regulation Ensures Stability and Rapid Reversibility of a Cellular State. *Mol Cell.* 2013. doi:10.1016/j.molcel.2013.04.014
9. Saigusa T, Tero A, Nakagaki T, Kuramoto Y. Amoebae anticipate periodic events. *Phys Rev Lett.* 2008;100(1):1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.100.018101