

Сопоставление паттернов экспрессии генов *c-fos* и *arc* в головном мозге мышей при формировании и извлечении обстановочной ассоциативной памяти

Л. С. Казанская¹, О. И. Ивашкина², К. А. Торопова³, К. В. Анохин⁴

В работе проводили оценку индукции немедленных ранних генов *c-fos* и *Arc/Arg3.1* в мозге мышей после формирования и извлечения памяти в задаче условно-рефлекторного замирания на обстановку. Показано, что при данном воздействии в ряде структур мозга происходит индукция обоих генов, однако только в 30% нейронов экспрессируются одновременно оба гена.

Ключевые слова: немедленные ранние гены; *c-Fos*; *Arc*; нейропластичность; энграмма

1. Актуальность

Одним из ключевых этапов консолидации долговременной памяти является экспрессия немедленных ранних генов (НРГ), которые запускают в нейронах процессы синаптической пластичности. Нейроны, экспрессировавшие данные гены во время обучения, можно отнести к энграммным клеткам, поскольку их реактивация способна вызывать извлечение памяти у животных [1, 2]. На сегодняшний день известно большое количество НРГ, однако, вопрос о том, частично или полностью совпадают популяции нейронов, экспрессирующие разные НРГ, изучен недостаточно.

¹ *Казанская Лидия Сергеевна* — Аспирант, лаборант-исследователь, ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, e-mail: lidia.kazanskaya@gmail.com.

Kazanskaya Lidiya Sergeevna — ?

² *Ивашкина Ольга Игоревна* — Младший научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия, e-mail: oivashkina@gmail.com.

Ivashkina Olga Igorevna — Junior Researcher, NRC «Kurchatov Institute, Institute of Advanced Brain Studies of Lomonosov MSU

³ *Торопова Ксения Александровна* — Младший научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия. Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: xen.alexander@gmail.com.

Toropova Ksenia Aleksandrovna — Junior Researcher, NRC «Kurchatov Institute, Institute of Advanced Brain Studies of Lomonosov MSU

⁴ *Анохин Константин Владимирович* — Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия. Заведующий лабораторией, ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, e-mail: k.anokhin@gmail.com.

Anokhin Konstantin Vladimirovich — Director of Institute of Advanced Brain Studies of Lomonosov MSU, Academician of Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Sciences in Medicine

В данном исследовании для сравнения паттернов экспрессии были выбраны НРГ *c-fos* и *Arg/Arg3.1*. Оба этих гена хорошо изучены, проявляют высокую активность в мозге при обучении, могут экспрессироваться в нейронах практически всех отделов мозга и при этом имеют низкий базальный уровень экспрессии [3, 4], что важно для выявления энграмм. Однако, роли *c-fos* и *Arg* в пластичности нейрона значительно различаются. Так, белок *Arg* сразу же после синтеза вовлекается в структурные изменения нейрона, тогда как влияние транскрипционного фактора *c-Fos* можно наблюдать только после второй волны синтеза белка. В то время как *Arg* преимущественно ослабляет синапсы в дендритах [5], *c-Fos* опосредует менее специфические изменения, захватывающие нейрон целиком: например, способствует образованию новых синапсов [6], синтезу некоторых нейромедиаторов [3] и росту аксона [7]. Кроме того, данные гены имеют различия в структуре промоторов [8], таким образом, они могут экспрессироваться в разное время после когнитивного воздействия или в разных нейронах.

2. Методика

В исследовании были использованы 5 групп мышей C57Bl/6: а) животные после однократного обучения условно-рефлекторному замиранию на обстановку (n=7); б) активный контроль (АК), взятый после обучения (n=7); в) животные после тестирования памяти (n=7); г) АК, взятый после тестирования памяти (n=7); д) пассивный контроль (ПК), взятый из домашней клетки (n=4). В ходе обучения животных на 3 минуты помещали в камеру с электродным полом и подавали электро-кожное раздражение (ЭКР) силой 1мА на 2с спустя 2 минуты обследования обстановки. Тестирование памяти происходило через 24 часа после обучения и представляло собой помещение в ту же камеру на 3 минуты без ЭКР. Животные из групп АК проходили через те же процедуры, что и опытные животные, но не получали ЭКР при обучении. Всех животных спустя 90 минут после поведенческих процедур умерщвляли летальной дозой хлоралгидрата и подвергали перфузии с раствором формальдегида. Срезы мозга животных толщиной 50мкм изготавливали на вибраторе, а затем использовали для двойного иммуногистохимического окрашивания на белки *c-Fos* и *Arg*. На изображениях срезов, полученных при помощи конфокального микроскопа Olympus FluoView FV10i, вручную в программе Imaris был проведён подсчёт числа клеток, меченых по *c-Fos*, по *Arg* и клеток, содержащих обе метки. Последние считались клетками с колокализацией экспрессии. В дальнейшем рассчитывали количество клеток с колокализацией экспрессии относительно всех *c-Fos+* или *Arg+* клеток.

3. Результаты

Иммуногистохимический анализ показал индукцию c-fos и Arc в ответ на новизну: было показано увеличение количества c-Fos+ и Arc+ во многих исследованных структурах мозга животных экспериментальных групп и групп АК по сравнению с ПК. Однако, между опытной группой и соответствующим АК уровень экспрессии как c-fos, так и Arc ни в одной структуре значимо не различался.

После обучения уровни экспрессии c-fos и Arc у животных опытной группы были значимо повышены в ретроспленциальной и париетальной коре по сравнению с ПК. При этом в ретроспленциальной коре не было значимых различий между количеством Arc+ и c-Fos+ нейронов, а в париетальной коре количество Arc+ клеток было значимо большим, чем количество c-Fos+ клеток у обученных животных. В гиппокампе как у животных группы обучения, так и у АК, не наблюдалось увеличение экспрессии c-fos и Arc по сравнению с ПК, но количество Arc+ нейронов значимо превосходило количество c-Fos+ нейронов.

После тестирования памяти в гиппокампе также не наблюдалось различий в уровне экспрессии генов между ПК и экспериментальной группой, а также группой АК, но численность Arc+ клеток в этих группах была значимо большей, чем численность c-Fos+ клеток. Похожий паттерн наблюдался и в цингулярной коре, где по обоим генам не было обнаружено значимых различий с ПК, но количество Arc+ нейронов была значимо большим, чем количество c-Fos+ нейронов только в группе АК. В миндалине и инфраламбической коре уровни экспрессии c-fos и Arc были повышены по сравнению с ПК, но не различались между собой.

Важно отметить, что независимо от исследуемой структуры мозга, поведенческой задачи и индивидуальных уровней экспрессии c-fos и Arc, между двумя популяциями меченых клеток было только частичное перекрытие, при котором порядка 30% клеток, экспрессировавших один ген, также экспрессировали второй. Объяснением небольшому перекрытию популяций c-Fos+ и Arc+ клеток при сопоставимой численности этих популяций может служить их неодинаковое распределение по кортикальным слоям и субполям гиппокампа, которое наблюдалось визуально при подсчёте клеток. Подробный анализ данного явления будет проведён в продолжении данной работы.

4. Заключение

Наши результаты показывают, что белки c-Fos и Arc не являются эквивалентными маркерами нервной активности, индуцированной стимулом, поскольку они экспрессируются в популяциях клеток, различных более

чем на 60%. При этом популяция Arg3.1+ клеток насчитывала больше нейронов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2020-801) и междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

Список литературы

- [1] Ghandour K, Ohkawa N, Fung CCA, Asai H, Saitoh Y, Takekawa T, Okubo-Suzuki R, Soya S, Nishizono H, Matsuo M, Osanai M, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Sakurai T, Kitamura T, Fukai T, Inokuchi K, “Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram.”, *Nat Commun.*, **10:1** (2019), 2637 10.1038/s41467-019-10683-2.
- [2] Lacagnina AF, Brockway ET, Crovetti CR, Shue F, McCarty MJ, Sattler KP, Lim SC, Santos SL, Denny CA, Drew MR., “Distinct hippocampal engrams control extinction and relapse of fear memory”, *Nat Neurosci.*, **22:5** (2019), 753–761 10.1038/s41593-019-0361-z.
- [3] Herdegen T, Leah JD., “Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins.”, *Brain Res Brain Res Rev.*, **28:3** (1998), 370-490 10.1016/s0165-0173(98)00018-6.
- [4] Korb E, Finkbeiner S., “Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior”, *Trends Neurosci.*, **34:11** (2011), 591-598 10.1016/j.tins.2011.08.007.
- [5] Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H., “Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace”, *Front Mol Neurosci.*, **8** (2016), 78 10.3389/fnmol.2015.00078.
- [6] Kleim JA, Lussnig E, Schwarz ER, Comery TA, Greenough WT., “Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning”, *J Neurosci.*, **16:14** (1996), 4529-4535 10.1523/jneurosci.16-14-04529.1996.
- [7] Jessen U, Novitskaya V, Pedersen N, Serup P, Berezin V, Bock E., “The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritegenesis in PC12-E2 cells”, *J Neurosci.*, **79:6** (2001), 1149-1160 10.1046/j.1471-4159.2001.00636.x.
- [8] Flavell SW, Greenberg ME, “Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system”, *Annu Rev Neurosci.*, **31** (2008), 563-590 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631.

Comparison Of C-Fos And Arc Genes Expression Patterns In Mouse Brain After Contextual Associative Memory Formation And Retrieval

Kazanskaya L.S., Ivashkina O.I., Toropova K.A., Anohin K.V.

The study evaluated the induction of immediate early genes *c-fos* and *Arc/Arg3.1* in mouse brain after contextual fear conditioning and after memory retrieval. It was shown that the induction of both genes

in a number of brain structures occurs after this exposure, however, only 30% of neurons simultaneously express both genes.

Keywords: immediate early genes, c-Fos, Arc, neuroplasticity, engram

References

- [1] Ghandour K, Ohkawa N, Fung CCA, Asai H, Saitoh Y, Takekawa T, Okubo-Suzuki R, Soya S, Nishizono H, Matsuo M, Osanai M, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Sakurai T, Kitamura T, Fukai T, Inokuchi K, “Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram.”, *Nat Commun.*, **10:1** (2019), 2637 10.1038/s41467-019-10683-2.
- [2] Lacagnina AF, Brockway ET, Crovetti CR, Shue F, McCarty MJ, Sattler KP, Lim SC, Santos SL, Denny CA, Drew MR., “Distinct hippocampal engrams control extinction and relapse of fear memory”, *Nat Neurosci.*, **22:5** (2019), 753–761 10.1038/s41593-019-0361-z.
- [3] Herdegen T, Leah JD., “Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins.”, *Brain Res Brain Res Rev.*, **28:3** (1998), 370-490 10.1016/s0165-0173(98)00018-6.
- [4] Korb E, Finkbeiner S., “Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior”, *Trends Neurosci.*, **34:11** (2011), 591-598 10.1016/j.tins.2011.08.007.
- [5] Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H., “Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace”, *Front Mol Neurosci.*, **8** (2016), 78 10.3389/fnmol.2015.00078.
- [6] Kleim JA, Lussnig E, Schwarz ER, Comery TA, Greenough WT., “Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning”, *J Neurosci.*, **16:14** (1996), 4529-4535 10.1523/jneurosci.16-14-04529.1996.
- [7] Jessen U, Novitskaya V, Pedersen N, Serup P, Berezin V, Bock E., “The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuriteogenesis in PC12-E2 cells”, *J Neurosci.*, **79:6** (2001), 1149-1160 10.1046/j.1471-4159.2001.00636.x.
- [8] Flavell SW, Greenberg ME, “Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system”, *Annu Rev Neurosci.*, **31** (2008), 563-590 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631.