KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 46, 1997
Numer 2 (235)
Strony 243–258

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

EVGENI NIKOLAEV
Pracownia Hodowli Komórek i Tkanek, Instytut im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

POBUDZENIE EKSPRESJI GENU *c-fos* JAKO JEDEN Z MOŻLIWYCH WARUNKÓW POWSTAWANIA ZMIAN PLASTYCZNYCH W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

EKSPRESJA GENÓW A PROCESY UCZENIA SIĘ

Zjawiska uczenia się i pamięci można rozpatrywać na wielu poziomach organizacji ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (ZIELIŃSKI 1993, KOSSUT 1994). Nie ulega jednak wątpliwości, że istotny w nich udział mają oddziaływania między komórkami nerwowymi, a w szczególności siła ich połączeń synaptycznych. Jednym z podstawowych zagadnień poznawczych jest zrozumienie molekularnego podłoża zmian zachodzących na synapsie. Ostatnio szczególnie wiele danych zgromadzono na temat roli fosforylacji i innych potranslacyjnych zmian białek tworzących synapsy w czasie powstawania śladów pamięciowych (BAILEY i KANDEL 1993). Jednakże można się spodziewać, że trwałość ufosforylowanej postaci białka nie przekracza kilku godzin (BARAŃSKA i współaut. 1994). Natomiast bardziej długotrwałe zmiany w wielu układach biologicznych wymagają zwiększonej ekspresji genów i biosyntezy nowych białek (KACZMAREK i KAMIŃSKA 1989).

Istnieją liczne dane doświadczalne wskazujące, z jednej strony hamujący wpływ inhibitorów syntezy białek i mRNA na tworzenie i utrzymanie się śladów pamięciowych (MATTHIES 1989a, b, KACZMAREK 1994), z drugiej zaś strony wzmożoną syntezę nowych białek i RNA jako konsekwencję pobudzenia ekspresji pewnych genów w procesach uczenia się (MATTHIES 1989a, b). W odniesieniu do udziału genów w procesach uczenia się i pamięci najwięcej danych zgromadzono do tej pory na temat tak zwanych genów odpowiedzi wczesnej IEG (immediate early genes). Obecnie znanych jest już kilkadziesiąt genów z tej grupy, wśród których bardzo dużym zainteresowaniem cieszy się protoonkogen *c-fos*.

FUNKCJONALNE ZNACZENIE GENU *c-fos*

Nazwa „fos" pochodzi od nazwiska jednego z grupy badaczy angielskich (Finkel-Biskis-Jinkins) oraz opisanego przez nich retrowirusa wywołującego mięsaka kości (ang. murine osteogenic sarcoma). Jak się okazało, jedną z przyczyn, doprowadzających do zachorowania, jest onkogen wirusowy (*v-fos*, viral-fos) (CURRAN i TEICH 1982, MORGAN i CURRAN 1991a). W materiale genetycznym komórek prawidłowych występuje gen bardzo podobny do genu *v-fos*. Gen ten, określony jako protoonkogen *c-fos* (od ang. cellular — komórkowy), nie posiada cechy złośliwości.

Podstawowy poziom mRNA *c-fos*, jak i białka c-Fos jest niewysoki w większości typów komórek. Ulega on jednak gwałtownemu, choć krótkotrwałemu zwiększeniu po różnorakim pobudzeniu (KACZMAREK i KAMIŃSKA 1989). Ustalono, że czas półtrwania mRNA *c-fos* wynosi około 12–15 minut (MORGAN i CURRAN 1991a, EDWARDS 1994). Białko c-Fos, powstające w wyniku ekspresji protoonkogenu *c-fos*, jest rozpuszczalne i gromadzone w jądrze komórkowym. Czas półtrwania tego białka też nie jest długi i wynosi około dwóch godzin (MORGAN i CURRAN 1991a). Nie do końca jest znany mechanizm regulacji ekspresji genu *c-fos*, choć warto zwrócić uwagę, że białko c-Fos może uczestniczyć w negatywnej autoregulacji aktywności własnego genu (EDWARDS 1994, ROBERTSON i współaut. 1995).

Zasadnicza funkcja białka c-Fos wyraża się przez jego udział w czynniku transkrypcyjnym AP-1 (activator protein 1). AP-1 jest dimerem

białkowym, składającym się z białek rodziny Fos (znanych jest przynajmniej czterech członków tej rodziny: c-Fos, Fos B, Fra-1 i Fra-2) oraz białek rodziny Jun (c-Jun, Jun B, Jun D). Czynniki transkrypcyjne łączą się ze swoistymi dla siebie sekwencjami różnych genów, wpływając na ich ekspresję. Uważa się, że są w ten sposób zdolne do koordynacji daleko idących zmian w komórce, zależnych od modulacji czynności genomu.

Można się więc spodziewać, że równie ważną, regulatorową rolę spełnia w komórkach produkt ekspresji protoonkogenu *c-fos*. W istocie, podwyższona jego ekspresja jest obserwowana w wielu sytuacjach fizjologicznych, na przykład w okresie pobudzenia komórek spoczynkowych do podziału komórkowego, indukcji procesu różnicowania, stymulacji komórek końcowo zróżnicowanych (KACZMAREK i KAMIŃSKA 1989). Co więcej, wykazano również funkcjonalny udział białka c-Fos w niektórych z tych procesów. Na przykład swoiste zahamowanie ekspresji tego genu lub podanie przeciwciała anty-c--Fos do komórek w okresie przejścia Go-S w cyklu komórkowym blokuje ten proces (p. ANGEL i KARIN 1991, KACZMAREK i KAMIŃSKA 1989).

EKSPRESJA *c-fos* W KOMÓRKACH NERWOWYCH

EKSPRESJA *c-fos* W KOMÓRKACH PC12

W badaniach zależności ekspresji genów od czynników ją wywołujących, przeprowadzonych na komórkach szczurzej linii nowotworu rdzenia nadnerczy (PC12), zwrócono uwagę, że komórki potraktowane czynnikiem wzrostu nerwów (NGF) przestają się dzielić i różnicują się w kierunku neuronów (GREENE i TISCHLER 1982). Stwierdzono, że procesowi temu towarzyszy pobudzenie ekspresji różnych genów odpowiedzi wczesnej, w tym i protoonkogenu *c-fos* (CURRAN i MORGAN 1985, GREENBERG i współaut. 1985, KRUIJER i współaut. 1985). Wzór ekspresji *c-fos*, odnotowany w przypadku różnicowania się komórek PC12, jest bardzo podobny do obserwowanego w innych procesach aktywacji komórek, cechując się raptownym wzrostem poziomu mRNA i szybkim jego spadkiem do wartości wyjściowych. Trzeba dodać, że w już zróżnicowanych komórkach PC12 ekspresję *c-fos* można pobudzić poprzez depolaryzację błony komórkowej (GREENBERG i współaut. 1986, MORGAN i CURRAN 1986, KRUIJER i współaut. 1985) za pomocą agonistów receptorów nikotynowych (GREENBERG i współaut. 1986), analogów cAMP (GREENBERG i współaut. 1985, KRUIJER i współaut. 1985), a także innych czynników. Seria doświadczeń nad komórkami PC12 stanowiła wstęp i dobre uzasadnienie badań ekspresji genów w komórkach nerwowych ośrodkowego układu nerwowego.

EKSPRESJA *c-fos* W KOMÓRKACH HODOWLI NEURONALNEJ

Podstawowym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym kręgowców jest glutaminian lub jego analogi — aminokwasy pobudzające (excitatory amino acids — EAA) (GŁAŻEWSKI 1992). Wśród receptorów EAA szczególne znaczenie dla powstawania i utrzymania się zmian plastycznych w układzie nerwowym mają zaś receptory NMDA (od nazwy ich agonisty — kwasu *N*-metylo-D-asparaginowego) (GŁAŻEWSKI 1992, MAYER i WESTBROOK 1987, MACDERMOTT i DALE 1987, NOWAK i współaut. 1984, SIEROCIŃSKA i współaut. 1991). Wiadomo, że aktywacja receptorów dla glutaminianu wywołuje całą kaskadę zmian, zachodzących w komórce po jej stymulacji, która może doprowadzić do pobudzenia ekspresji różnych genów, w tym i protoonkogenu *c-fos*. Podanie, na przykład, agonistów receptorów dla glutaminianu do hodowli astrocytów wywołuje indukcję ekspresji *c-fos* (CONDORELLI i współaut. 1989, 1993). Bardzo podobny efekt ma potraktowanie glutaminianem lub NMDA neuronów kory i prążkowia *in vitro* (MURPHY i współaut. 1991a, VACCARINO i współaut. 1991, CONDORELLI i współaut. 1994).

Prawdopodobnie różne receptory dla glutaminianu mogą uczestniczyć w pobudzeniu ekspresji *c-fos*, na co wskazują wyniki VACCARINO i współautorów (1991) oraz CONDORELLIego i współautorów (1994) otrzymane z hodowli neuronalnych. MURPHY i współpracownicy (1991b) w doświadczeniach przeprowadzonych na długotrwałych hodowlach neuronów stwierdzili, że za aktywację *c-fos* jest odpowiedzialna spontaniczna depolaryzacja błony komórkowej, w której uczestniczą receptory typu K/A (od nazw agonistów: kainianu i AMPA — alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego). Jeszcze wcześniej, SZEKELY ze współpracownikami (1987, 1989), badając pobudzenie ekspresji *c-fos* w ziarnistych komórkach móżdżku *in vitro* po ich stymulacji glutaminianem lub NMDA, wykazali wzrost indukcji badanego genu. Ekspresja ta może być całkowicie zablokowana poprzez dodanie jednego z antagonistów receptorów NMDA — APV (kwas amino-5-fosfo-

nowalerianowy). Ci sami autorzy (SZEKELY i współaut. 1990) udowodnili, że w warunkach opisanych powyżej równolegle z akumulacją mRNA *c-fos* występuje gromadzenie mRNA innych genów, a mianowicie: *c-jun, jun-B* i *zif268*. Podanie CPP i PCP (antagonistów receptorów NMDA) całkowicie hamuje ekspresję wszystkich tych genów. Natomiast dodanie CNQX (antagonisty receptorów dla glutaminianu z grupy nie NMDA) nie ma znaczącego wpływu na gromadzenie mRNA *c-fos* i *c-jun*, spowodowane glutaminianem (BADING i współaut. 1995).

EKSPRESJA *c-fos* W MÓZGU *IN VIVO*

Jednocześnie z prowadzeniem badań nad ekspresją różnych genów odpowiedzi wczesnej w hodowlach neuronalnych zastanawiano się, czy podobne zjawisko występuje w mózgu żywego zwierzęcia. Można było sądzić, że aktywacja genów w mózgu także może być związana z pobudzeniem receptorów dla glutaminianu. Istotnie wykazano, że podanie glutaminianu bezpośrednio do mózgu szczura, w okolice hipokampa, wywołuje bardzo wyraźny ale przejściowy wzrost poziomu mRNA *c-fos* w tej strukturze (KACZMAREK i współaut. 1988). Trzeba jednak dodać, że iniekcja soli fizjologicznej, przeprowadzona dokładnie w taki sam sposób i zastosowana jako kontrola dla glutaminianu, też doprowadza do pobudzenia ekspresji *c-fos* tyle, że w mniejszym stopniu (KACZMAREK i współaut. 1988). Stwierdzono również, że obwodowe podanie NMDA powoduje nagromadzenie mRNA *c-fos* w wielu regionach mózgu szczura z tym, że w zakręcie zębatym hipokampa i korze śródwęchowej wzrost ten jest największy (MORGAN i LINNOILA 1991). Podobne dane o aktywacji ekspresji *c-fos* w hipokampie szczura, w wyniku iniekcji NMDA, zostały otrzymane przez SONNENBERG i współpracowników (1989b). Zastosowanie zaś antagonistów receptorów NMDA hamuje ekspresję mRNA i białka c-Fos, występującą w mózgu na poziomie podstawowym (WORLEY i współaut. 1990). Dane te wskazują na istotny związek pomiędzy receptorami NMDA a ekspresją protoonkogenu *c-fos*.

Podanie szczurom i myszom innego agonisty receptorów dla glutaminianu-kainianu, wywołującego u zwierząt drgawki podobne do epileptycznych oraz neurodegenerację, powoduje bardzo silny wzrost poziomu mRNA *c-fos* w mózgu tych zwierząt (SONNENBERG i współaut. 1989b, MORGAN i CURRAN 1991b). Podobnie jak w przypadku podania NMDA, największą akumulację mRNA *c-fos* obserwowano w hipokampie i w korze śródwęchowej. Wykazano także, że po wzroście ekspresji protoonkogenu *c-fos*, następuje wzmożona synteza jego białka (LE GAL LA SALLE, 1988, POPOVICI i współaut. 1990, PENNYPACKER i współaut. 1993, SAKURAI-YAMASHITA i współaut. 1991). Zwrócono także uwagę na zmiany w poziomie aktywności dimeru białkowego AP-1 w mózgu zwierząt poddanych działaniu kwasu kainowego. Stwierdzono, że w ciągu kilku godzin po podaniu kainianu występuje pierwszy szczyt wzrostu poziomu wiązania się AP-1 z DNA (SONNERBERG i współaut. 1989a, PENNYPACKER i współaut. 1993). Następnie zaś wykazano istnienie także drugiej fali wzrostu aktywności AP-1, która następuje po trzech dniach od chwili potraktowania zwierząt kainianem (KAMIŃSKA i współaut. 1994).

Sztuczne wywoływanie drgawek padaczkopodobnych u zwierząt jest często stosowane w badaniach nad zmianami plastycznymi zachodzącymi w mózgu po takim wstrząsie. Drgawki te mogą być wywołane w różny sposób i różnymi środkami. Jednym z środków chemicznych wprowadzającym zwierzęta w stan drgawkowy jest pentylenetetrazol (metrazol) (antagonista receptorów $GABA_a$). Podany dootrzewnowo metrazol bardzo szybko, w ciągu 5-10 minut, wywołuje napady drgawkowe, które mogą trwać do 30 minut (MORGAN i współaut. 1987). Stwierdzono, że w wyniku tych napadów w mózgu zwierząt gromadzi się mRNA różnych genów, również mRNA *c-fos* (MORGAN i współaut. 1987, 1991a, b). Obserwowano kilkakrotny wzrost poziomu ekspresji *c-fos* w porównaniu z poziomem jego ekspresji u zwierząt kontrolnych (dootrzewnowe podanie soli fizjologicznej). Także i w tym przypadku wzór pobudzenia ekspresji *c-fos* jest podobny do spowodowanego podaniem NMDA. Wiadomo, że wywołaną metrazolem ekspresję *c-fos* można całkowicie lub częściowo zablokować, stosując znane środki przeciwdrgawkowe, takie jak diazepam i kwas walproinowy lub APV i MK-801, co dowodzi udziału receptorów NMDA w tym procesie (SONNENBERG i współaut. 1989b). Wykazano także zwiększoną immunoreaktywność na białko c-Fos i wzrost poziomu AP-1 w różnych obszarach mózgu zwierząt w dwie godziny po napadach drgawkowych (CURRAN i MORGAN 1987, SONNENBERG i współaut. 1989a, SHEHAB i współaut. 1993, LUKASIUK i KACZMAREK 1994). Znany jest także fakt, że agonista kanałów wapniowych, wykorzystywany jako środek owadobójczy, gamma-heksachlorocykloheksan (lindane), podany dootrzewnowo, także wywołuje drgawki padaczkopodobne, w wyniku których zanotowano podwyższoną ekspresję *c-fos* w korze i obszarze hipokampalnym szczurów (VENDRELL i współaut. 1992a, b).

Stwierdzono także, że w przypadku rozszerzającej się depresji (spreading depression), na skutek której występują u zwierząt drgawki padaczkopodobne, poziom ekspresji *c-fos* jest podwyższony (HERRERA i współaut. 1990a, MORGAN i CURRAN 1991b, MAGGIO i ROBERTSON 1993). Dootrzewnowa iniekcja bikukuliny również wywołuje u szczurów drgawki padaczkopodobne, po których wykazano wzmożoną reakcję wiązania przeciwciał do białka c-Fos w mózgu tych zwierząt (HERDEGEN i współaut. 1993). Także po drgawkach spowodowanych zastosowaniem elektrowstrząsu (40 mA, 1 s), obserwuje się zwiększoną immunoreaktywność na białko Fos (SHEHAB i współaut. 1993).

Mechanizmów fizjologicznych doprowadzających do powstawania drgawek padaczkopodobnych może być kilka, ale ich wspólną cechą jest zmiana (w różny sposób) przenikliwości błony komórkowej neuronów dla jonów wapnia. Uczestniczą w tym różne receptory i kanały wapniowe. Wapń, wchodząc do komórki, doprowadza do depolaryzacji błony neuronu i generacji na niej potencjałów czynnościowych. Ognisko padaczkowe powstaje jednocześnie w wielu neuronach i bardzo szybko może się rozpowszechnić na cały mózg. Po takim zajściu w obszarach mózgu objętych stanem padaczkowym obserwuje się podwyższoną ekspresję protoonkogenu *c-fos*.

Także w innych, zupełnie odmiennych sytuacjach doświadczalnych, takich jak ogólne lub miejscowe niedotlenienie mózgu (HERRERA i ROBERTSON 1989, NOWAK i współaut. 1990, WELSH i współaut. 1992, KIESSLING i współaut. 1993) podanie niektórych neuropeptydów (GIRI i współaut. 1990, IMAKI i współaut. 1993), stymulacja bólowa (BIRDER i DE-GROAT 1993), unieruchomienie zwierząt (SENBA i współaut. 1993), podanie agonistów dla receptorów dopaminowych (ROBERTSON i współaut. 1991), uszkodzenia nerwów, szlaków nerwowych lub struktur mózgu (HERRERA i ROBERTSON 1990b, CHEN i HILLMAN 1992, MOLANDER i współaut. 1992, HERDEGEN i współaut. 1993) a także w wyniku stymulacji sensorycznej (HUNT i współaut. 1987) stwierdza się wzrost ekspresji protoonkogenu *c-fos* w OUN.

EKSPRESJA *c-fos* W PROCESACH PLASTYCZNOŚCI NEURONALNEJ

PLASTYCZNOŚĆ NEURONALNA JAKO CECHA UKŁADU NERWOWEGO

Plastyczność jest cechą układu nerwowego, która określa jego zdolność do ulegania względnie trwałym zmianom strukturalnym pod wpływem przetwarzanych informacji. Pojęcie to po raz pierwszy tak ściśle zdefiniował i wprowadził w życie polski neurofizjolog, J. KONORSKI (1948). Według Konorskiego „...własność, dzięki której w określonych układach neuronów powstają trwałe przekształcenia funkcjonalne w wyniku określonych bodźców lub ich kombinacji, będziemy nazywać plastycznością, a odpowiadające im zmiany, zmianami plastycznymi..." (cyt. za ŻERNICKIM 1994). W istocie, pod zmianami strukturalnymi powstającymi w układzie nerwowym po działaniu bodźców zewnętrznych rozumiemy zmiany w przewodnictwie synaptycznym neuronów OUN, spowodowane przekształceniami samych synaps lub reorganizacji ich liczby.

EKSPRESJA *c-fos* SPOWODOWANA KINDLINGIEM

Mechanizmy różnych form plastyczności neuronalnej u zwierząt próbuje się poznać już od kilkudziesięciu lat, wykorzystując różne sytuacje modelowe. Jednym z tych modeli jest zjawisko kindlingu (nazywanego inaczej rozniecaniem), które można określić jako postępujący wzrost odpowiedzi neuronalnych w następstwie słabego, przerywanego drażnienia niewielkiego obszaru mózgu. Bodźcem inicjującym może być drażnienie elektryczne, chemiczne, metaboliczne lub czuciowe. W większości doświadczeń stosuje się drażnienie elektryczne, które najłatwiej można kontrolować. W praktyce technika kindlingu polega na codziennym drażnieniu określonej struktury mózgu słabym bodźcem elektrycznym, który nie wywołuje widocznych zmian w zachowaniu się zwierząt a tylko śladowe bioelektryczne wyładowania następcze w mózgu. Po kilkunastu podobnych drażnieniach wyładowania następcze robią się coraz dłuższe i zaczynają promieniować do coraz większych obszarów mózgu, obejmując je w końcowej fazie kindlingu bioelektrycznymi wyładowaniami padaczkowymi. Wyładowaniom tym towarzyszą toniczno-kloniczne napady padaczkowe. Trzeba dodać, że po dostatecznie długim stosowaniu cyklicznego drażnienia mózgu napady padaczkowe mogą występować „samoistnie", bez poprzedzającego drażnienia elektrycznego.

Istotną cechą kindlingu jest to, że zmiany plastyczne, zachodzące w mózgu w wyniku drażnienia, utrzymują się przez bardzo długi czas. Możliwe, że podstawą tak długo utrzymujących się zmian w plastyczności neuronalnej

ośrodkowego układu nerwowego jest zaangażowanie w kindlingu aparatu genetycznego komórek nerwowych. W istocie, w doświadczeniach przeprowadzonych przez DRAGUNOWA i ROBERTSONA (1987), jak również SIMONATU i współpracowników (1991) stwierdzono istotny wzrost poziomu mRNA *c-fos* w hipokampie szczurów po kindlingu. Podobne wyniki, wykazujące wzmożoną ekspresję protoonkogenu *c-fos* po drgawkach spowodowanych kindlingiem, otrzymał TESKEY i współpracownicy (1991), wykorzystując do powstawania kindlingu elektryczne drażnienie ciała migdałowatego. W półkuli nie poddanej drażnieniu i, wobec tego, pozbawionej wyładowań następczych, poziom pobudzenia ekspresji *c-fos* był podobny do poziomu *c-fos* w półkuli drażnionej, co mogłoby świadczyć o niezależności występowania ekspresji genu *c-fos* od lokalizacji pojawienia się wyładowań następczych. Wykazano także, iż poziom ekspresji *c-fos* podniesiony w wyniku kindlingu spadał do wartości wyjściowych w ciągu trzech tygodni od zaprzestania drażnienia (TESKEY i współaut. 1991).

CLARK i współautorzy (1991) stwierdzili, że pobudzenie genu *c-fos* w różnych obszarach obu półkul mózgu szczurów jest zależne od stadiów powstawania kindlingu. W szczególności podwyższona ekspresja *c-fos* występowała w początkowym okresie wytwarzania reakcji. Zbadali ponadto ekspresję genu *c-fos* w mózgu szczurów w kilku odmiennych sytuacjach doświadczalnych, a mianowicie: po jednorazowym podaniu drgawkogennej dawki kokainy, po pierwszym wystąpieniu drgawek padaczkopodobnych spowodowanych kindlingiem kokainowym i u zwierząt poddanych procesowi kindlingu przed wystąpieniem pierwszych drgawek padaczkopodobnych. Stwierdzono, że istotny wzrost poziomu *c-fos* mRNA był obserwowany tylko u szczurów po jednorazowym podaniu drgawkogennej dawki kokainy i po pierwszym wystąpieniu drgawek spowodowanych kindlingiem kokainowym.

Zastosowanie antagonistów receptorów NMDA poprzedzające występowanie drgawek spowodowanych kindlingiem istotnie zmniejszało wzrost poziomu mRNA *c-fos* w ziarnistych komórkach zakrętu zębatego hipokampa szczurów (LABINER i współaut. 1993), co wskazuje na udział receptorów NMDA w tym procesie.

Ostatnio WATANABE i współautorzy (1996) zwrócili uwagę na funkcjonalny udział *c-fos* w kindlingu, wykazując, że u myszy pozbawionych czynnego genu w wyniku homologicznej rekombinacji (knock-out) kindling jest poważnie zaburzony.

DŁUGOTRWAŁE WZMOCNIENIE SYNAPTYCZNE A EKSPRESJA *c-fos*

LTP jako model plastyczności neuronalnej

Jedną z najlepiej poznanych form plastyczności, bardzo często wykorzystywaną w badaniach nad istotą tej cechy układu nerwowego i traktowaną jako model procesu uczenia się (BAILEY i KANDEL 1993), jest zjawisko długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. long term potentiation — LTP) (BLISS i LOMO 1973, BLISS i GARDNER-MEDWIN 1973). Zjawisko LTP, które może być wywoływane w różnych obszarach mózgu, w tym i w hipokampie, jest oparte o różne mechanizmy. Szczególnie wiele danych zgromadzono na temat wytwarzania LTP w zakręcie zębatym i polu CA1 hipokampa gryzoni. Powstawanie LTP w zakręcie zębatym hipokampa zachodzi w rezultacie krótkiego, wysokoczęstotliwościowego drażnienia (tzw. tetanizacji) wiązki przeszywającej (ang. perforant path). Przyjmuje się, że drażnienie takie doprowadza do zmian plastycznych w połączeniach między neuronami piramidowymi kory śródwęchowej a komórkami ziarnistymi zakrętu zębatego. Stosując ten model badawczy wykazano, że u zwierząt swobodnie się poruszających, nie poddanych znieczuleniu w czasie tetanizacji, zjawisko LTP może się utrzymywać przez bardzo długi okres (nawet do kilku miesięcy). Trzeba podkreślić, że nawet w takich warunkach można uzyskać LTP o różnej trwałości w zależności od sposobu drażnienia. Jedynie powtarzanie serii tetanizacji prowadzi do efektu naprawdę długotrwałego (KRUG i współaut. 1989, DRAGUNOW i współaut. 1989, JEFFERY i współaut. 1990, KACZMAREK 1992 WORLEY i współaut. 1993, DEMMER i współaut. 1993, ABRAHAM i współaut. 1993, NHUYEN i współaut. 1994, HUANG i współaut. 1994).

Ekspresja genów a LTP

Wiadomo, że wzmożone przewodnictwo synaptyczne jest w stanie utrzymywać się przez bardzo długi okres. Możliwe, że u podstaw takich długotrwałych zmian plastyczności neuronalnej spowodowanych tetanizacją, znajduje się zmieniona ekspresja określonych genów. Istotnie, DRAGUNOW i współautorzy (1989) wykazali wzrost ekspresji białka protoonkogenu *c-fos* w zakręcie zębatym hipokampa po wywołaniu LTP. Badając wpływ sposobu tetanizacji autorzy ci stwierdzili, że podwyższenie poziomu białka c-Fos w ziarnistych komórkach hipokampa występuje w wyniku zastosowania drażnienia składającego się z 50 krótkich (20 ms)

grup impulsów o częstotliwości 400 Hz przedzielonych 20-sekundowymi przerwami. Natomiast zastosowanie tetanizacji o tej samej częstotliwości ale skumulowanej w jednym zestawie drażnień, mimo iż prowadzi do LTP, nie wywołuje jednak wzrostu ekspresji c-Fos. Nie wykazano immunoreaktywności do c-Fos także u zwierząt kontrolnych, u których stosowano drażnienie o niskiej częstotliwości, jak też i w przypadku drażnienia wysokoczęstotliwego przy zablokowanych receptorach NMDA oraz tetanizacji prowadzonej w warunkach ostrych, to jest u zwierząt znajdujących się pod wpływem środków znieczulających. COLE i współautorzy (1989) obserwowali u około połowy badanych zwierząt wzrost poziomu mRNA *c-fos* w ziarnistych komórkach zakrętu zębatego hipokampa towarzyszący LTP. Trzeba dodać, że i w tym przypadku tetanizację zastosowano u zwierząt swobodnie się poruszających. Podobnie JEFFERY i współpracownicy (1990) badając LTP u zwierząt swobodnie się poruszających wykazali zwiększoną obecność białka c-Fos w komórkach ziarnistych hipokampa. Trzeba podkreślić, że obecność białka c-Fos lub mRNA *c-fos* wykrywano jedynie po takim drażnieniu, które prowadziło do wzmocnienia synaptycznego, trwającego co najmniej kilka tygodni. (patrz także: DEMMER i współaut. 1993, ABRAHAM i współaut. 1993, WORLEY i współaut. 1993, WISDEN i współaut. 1990, SCHREIBER i współaut. 1991). Wydaje się, że wyniki większości doniesień z ostatnich lat dowodzą, że długotrwałe wzmocnienie synaptyczne, w zależności od sposobu drażnienia, można podzielić na trzy rodzaje różniące się między sobą czasem trwania: LTP1 trwające nie więcej niż kilka godzin, LTP2 utrzymujące się do kilku dni i LTP3, które da się wykryć nawet po kilku tygodniach. Ekspresja genu *c-fos* towarzyszy w sposób powtarzalny tylko LTP3 (p. BLISS i COLLINGRIDGE 1993).

Można zatem sądzić, że mechanizmy odpowiadające zarówno za powstawanie kolejnych faz LTP, jak i za ich utrzymanie, są różne. Ponieważ wykazano, że tylko w okresie powstawania LTP3 zachodzi wzmożona biosynteza białek (FREY i współaut. 1988, KRUG i współaut. 1984, MATTHIES 1989b, OTANI i ABRAHAM 1989), można przypuszczać, że podstawą tego najdłużej utrzymującego się rodzaju wzmocnienia przewodnictwa synaptycznego (LTP3) jest pobudzenie genomu. Dlatego też celem naszego doświadczenia, które zostało wykonane w pracowni H. Matthies'a w Akademii Medycznej w Magdeburgu, było zbadanie, czy wywoływanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ściślej LTP3) doprowadza do zwiększonej ekspresji genu *c-fos* w mózgu szczurów. Istotną rolę w wyborze miejsca przeprowadzenia doświadczenia odegrał fakt, że w tej pracowni w sposób powtarzalny otrzymywano LTP o najdłuższym czasie trwania (KRUG i współaut. 1984). Warunkiem uzyskiwania tak długiego LTP było zastosowanie czterech serii drażnień wiązki przeszywającej u zwierząt swobodnie się poruszających.

W wyniku doświadczenia wykazano, że jedynie w odstępie 45 min od rozpoczęcia tetanizacji dochodzi do ekspresji genu *c-fos* w hipokampie szczurów. Co więcej, wykryto wzrost pobudzenia tego genu w korze śródwęchowej w 45 min i 90 min po tetanizacji. Natomiast w 6 godz. i 24 godz. po tetanizacji, jak i po stymulacji niskoczęstotliwej (kontrolnej) nie stwierdzono wzrostu poziomu *c-fos* mRNA tak w hipokampie, jak i w korze śródwęchowej (NIKOLAEV i współaut. 1991).

EKSPRESJA *c-fos* W PROCESACH PLASTYCZNOŚCI KORY MÓZGOWEJ — PLASTYCZNOŚĆ ROZWOJOWA, OKRESY KRYTYCZNE

Dobrym modelem badawczym zmian plastycznych OUN wydają się być procesy postnatalnego rozwoju kory mózgowej, w szczególności w tak zwanych okresach krytycznych. Szczególnie dobrze są poznane zmiany plastyczne w korze czuciowej, zwłaszcza w korze wzrokowej. U kota okres krytyczny rozwoju kory wzrokowej jest obserwowany od 4 do 10 tygodni życia (HUBEL i współaut. 1977). U szczura podobny okres występuje około 20–40 dnia po urodzeniu (FAGGIOLINI i współaut. 1994). W tym czasie połączenia międzyneuronalne są szczególnie podatne na zmiany plastyczne, które mogą ulec utrwaleniu aż do końca życia zwierzęcia. Szereg danych wskazuje, że podłoże komórkowe i molekularne tych zmian jest zbliżone do podłoża procesów uczenia się i pamięci (KANDEL i O'DELL, 1992, KACZMAREK 1993). O podobnym podłożu rozwojowych zmian plastycznych oraz procesów uczenia się i pamięci świadczy między innymi fakt, że jedne i drugie zależą od aktywacji receptorów NMDA (COLLINRIDGE i SINGER 1990, KLEINSCHMIDT i współaut. 1987). Ponadto zarówno w procesach rozwojowych, jak i w czasie uczenia się jest wymagane pobudzenie ekspresji genów (KANDEL i O'DELL 1992).

Wykazano, że okresom krytycznym towarzyszy podwyższona ekspresja określonych genów kodujących czynniki transkrypcyjne, między innymi genu *c-fos* (MOWER 1994, KAMIŃSKA i współaut. 1995, KAPLAN i współaut. 1996. Poziom mRNA *c-fos* w korze wzrokowej kota znacząco wzrasta pomiędzy pierwszym a piątym tygodniem życia, po czym utrzymuje się na

bardzo wysokim poziomie do dwudziestego tygodnia życia i następnie spada po przejściu tego okresu (McCORMACK i współaut. 1992). Co więcej, wzór ekspresji białka c-Fos w warstwach kory wzrokowej kotów pięciotygodniowych różni się od podobnego wzoru w korze wzrokowej kotów dorosłych (MOWER 1994). U zwierząt znajdujących się w okresie krytycznym stymulacja wzrokowa pobudza wzrost immunoreaktywności c-Fos we wszystkich warstwach kory wzrokowej, a u starszych kotów jedynie w warstwie IV. Wskazuje to na szczególny charakter aktywności genu *c-fos* w okresie krytycznym. Efekty plastyczności rozwojowej często są badane techniką deprywacji czuciowej, która polega na pozbawieniu zwierząt dopływu określonej modalności sensorycznej. W doświadczeniach z deprywacją wzrokową przeprowadzoną na kotach w wieku 5 tygodni stwierdzono wyraźny wzrost ekspresji genu *c-fos*, jak również i innych genów po wystawieniu zwierząt na światło (ROSEN i współaut. 1992). Wynik ten wskazuje na zależność ekspresji genów od bodźca wzrokowego. WORLEY i współpracownicy (1991) wykazali z kolei, że w korze wzrokowej dorosłych szczurów na ekspresję niektórych genów, w tym i *c-fos*, ma wpływ aktywacja receptora NMDA. KAMIŃSKA i współautorzy (1996) wykazali, że wzrostowi białka c-Fos, wywołanemu przez bodziec czuciowy w korze wzrokowej dorosłych szczurów, towarzyszy nagromadzenie się czynnika AP-1. W podsumowaniu danych dotyczących poziomu i wzoru ekspresji *c-fos* z jednej strony a rozwojem kory wzrokowej oraz dopływem informacji czuciowej z drugiej strony, można stwierdzić, że istnieje interesująca, choć ciągle nie wyjaśniona, korelacja między tymi zjawiskami (KACZMAREK i HHAUDHURI 1997).

EKSPRESJA *c-fos* WYWOŁANA TRENINGIEM BEHAWIORALNYM

W badaniach ekspresji *c-fos* w procesach uczenia się ANOKHIN i współpracownicy (1991) wykorzystali naturalną skłonność kurcząt do dziobania. W teście biernego unikania, w którym pierwszy kontakt z przedmiotem o gorzkim smaku powoduje unikanie dziobania podobnego przedmiotu w przyszłości, autorzy ci zbadali nabywanie reakcji biernego unikania u jednodniowych kurcząt, wykazując przy tym, że procesowi temu towarzyszy podwyższona ekspresja genu *c-fos* w mózgu ptakow.

W innym eksperymencie, przeprowadzonym przez ten sam zespół badawczy (ANOKHIN i ROSE 1991) również na kurczętach jednodniowych, wykorzystano test różnicowania wzrokowego. Doświadczenie to składało się z dwóch faz: uczenia się i testu. Uczenie się polegało na umieszczeniu kurcząt w nowym środowisku, cechującym się podłogą pokrytą żwirem. W jednej z grup zwierząt żwir ten był pomieszany z pokarmem. Test, zastosowany następnego dnia po treningu, polegał na tym, że część kurcząt traktowano dokładnie tak samo jak dnia pierwszego, a w przypadku niektórych zmieniono warunki doświadczenia dodając pokarm do żwiru tym osobnikom, które poprzednio pokarmu nie miały. Analiza poziomu mRNA wykazała znaczący wzrost poziomu mRNA genów *c-fos* i *c-jun* w mózgach zwierząt w okresie pierwszego kontaktu z nowym środowiskiem, ale nie po ponownym eksponowaniu na to samo środowisko.

W następnym doświadczeniu wykorzystano całkowitą lateralizację drogi wzrokowej ptaków. Stwierdzono, że w wyniku uczenia się kurcząt reakcji biernego unikania z zamkniętym lewym lub prawym okiem dochodzi do podwyższonej ekspresji genu *c-fos* w przodomózgowiu półkuli przeciwległej do otwartego oka, czyli odbierającej z niego informację. Natomiast nie stwierdzono żadnego wzrostu poziomu *c-fos* mRNA w półkuli połączonej funkcjonalnie z okiem zamkniętym (ANOKHIN i współaut. 1991).

TISCHMEYER i współpracownicy (1990, 1994) w celu sprawdzenia indukcji genów odpowiedzi wczesnej w uczeniu się wykorzystali test różnicowania jasności światła u szczurów. Test przeprowadzono w aparacie w kształcie litery Y. Sesja treningowa trwała około 30 min. i składała się z kilkudziesięciu prób. Zadaniem szczura było wykonanie 20 reakcji prawidłowych, to jest ucieczki do oświetlonego ramienia aparatu po włączeniu się łagodnego szoku elektrycznego podanego przez metalowe pręty podłogi. Stwierdzono wzrost ekspresji mRNA genów *c-fos* i *jun B* w hipokampie szczurów po nauczeniu się tej reakcji. Podobny poziom mRNA *c-fos* został wykryty w hipokampie szczurów po pseudotreningu.

CASTRO-ALAMANCOS i współpracownicy (1992) badali u szczura nabywanie instrumentalnej reakcji obronnej naciskania na dźwignię. W toku doświadczenia zwierzęta w ciągu kolejnych sześciu sesji treningowych (jedna sesja dziennie), z których każda składała się z 30 prób, uczyły się reakcji unikania bodźca bólowego. Test, przeprowadzony siódmego dnia (24 godziny po ostatniej sesji treningowej), składał

się z pięćdziesięciu takich samych prób. Kontrolę stanowiły dwie grupy zwierząt: (i) kontrola pasywna, w której szczury były poddawane tylko ręcznej manipulacji (handlingowi) i (ii) kontrola aktywna, w której zwierzęta były traktowane tak samo jak w grupie doświadczalnej z tą różnicą, że nie miały możliwości uniknięcia bodźca bólowego. Interesujące, że w grupie zwierząt uczących się reakcji unikania i grupie zwierząt kontroli aktywnej wykazano wzrost ekspresji białka c-Fos w korze ruchowej, natomiast w hipokampie tych zwierząt nie wykryto żadnych zmian w ekspresji tego białka.

Podobne wyniki otrzymali HESS i współpracownicy (1995), którzy badali ekspresję genu *c-fos* w mózgu szczurów w teście wyuczonego węszenia (ang. nose poke task). W teście tym zwierzęta, które poprzednio były poddane deprywacji wodnej, uczyły się wsadzać swój pysk do niewielkich, około 2 cm średnicy, dziurek, znajdujących się w ścianie aparatu doświadczalnego. Nagrodą za udane wsadzenie nosa do dziurki była kropla wody. Zbadano trzy grupy szczurów: (i) grupę zwierząt kontrolnych, przebywających jedynie w klatce domowej; (ii) grupę zwierząt dobrze wyuczonych reakcji wyuczonego węszenia i, wreszcie, (iii) grupę szczurów, których na podstawie dobrze już znanej reakcji wyuczonego węszenia dodatkowo uczono odróżniania zapachów w ciągu jednej sesji treningowej. Wykazano wzrost ekspresji tego genu w korze wzrokowej w obu grupach treningowych, co było dla autorów pewnym zaskoczeniem, bowiem oczekiwano tego tylko w grupie szczurów uczących się odróżnienia zapachów. Porównanie jednak sesji treningowych z sesją testową w grupie zwierząt, w której zastosowano tylko test wyuczonego węszenia wykazuje istotne różnice. Po pierwsze, sesja testowa była prawie dwa razy dłuższa niż sesja treningowa; po drugie, zwierzęta wykonywały zadanie aż do chwili pełnego nasycenia, osiągając przez to inny stan fizjologiczny, nie osiągalny w sesjach treningowych. Zmiany te wskazują na wprowadzenie elementu nowości w porównaniu z sesjami treningowymi.

W innym doświadczeniu (ZHU i współaut. 1995) stwierdzono wzrost immunoreaktywności do c-Fos w korze czuciowej szczura po pokazaniu nowych obiektów.

HEURTEAUX i współpracownicy (1993) badali pobudzenie genów *c-fos* i *c-jun* u myszy w teście nabywania pokarmowej reakcji instrumentalnej w klatce skinnerowskiej. W doświadczeniu tym myszy początkowo uczyły się naciskania na dźwignię — 15 przypadkowych prób naciśnięcia na dźwignię w ciągu jednej dziesięciominutowej sesji treningowej były wzmocnione pokarmem. Następnie w dniu testu myszy miały za zadanie wykonanie czterdziestu takich samych prób. W wyniku tego doświadczenia stwierdzono wzrost ekspresji badanych genów w hipokampie. Trzeba dodać, że w hipokampach myszy z grupy kontrolnej, które zostały poddane procedurze pseudotreningu, także wykryto indukcję tych genów ale w stopniu istotnie mniejszym niż w grupie zwierząt normalnie trenowanych.

Interesującym modelem badania procesów uczenia się i pamięci jest nabywanie doświadczeń seksualnych przez naiwne pod tym względem samce szczurów. ROBERTSON i współpracownicy (1991) zastosowali następującą metodę uczenia się kopulacji u naiwnych samców. W ciągu jednej sesji doświadczalnej, trwającej trzydzieści minut naiwny szczur znajdował się w klatce razem z jedną samicą w rui. Po sześciu takich sesjach treningowych, po jednej dziennie, w których szczur mógł kopulować do ejakulacji, siódmego dnia zwierzęta były testowane. Test polegał na tym, że szczury w ciągu godziny mogły wykonywać akty kopulacyjne z kilkoma samicami po kolei. W rezultacie analizy immunocytochemicznej wykazano wzrost ekspresji białka c-Fos w różnych strukturach przodomózgowia i kory mózgowej szczurów.

W innym doświadczeniu nabywania przez szczury zachowania seksualnego BIAŁY i współpracownicy (1992) badali wpływ kolejnych sesji treningowych (każda sesja trwała do pierwszej ejakulacji) na poziom ekspresji mRNA *c-fos*. Wykryto nikły poziom ekspresji genu po pierwszej sesji, istotny zaś wzrost w korze czuciowej po trzech sesjach i powrót do wartości wyjściowych po siedmiu sesjach.

BRENNAN i współpracownicy (1992) badali pamięć zapachową u samic myszy wykorzystując zjawisko BRUCE'A (1961). Przejawia się ono w ten sposób, że jeżeli samicę określonego gatunku myszy, znajdującą się w stanie ciąży, w okresie do czterech–pięciu dni po kryciu eksponować na innego samca, to ciąża u tej samicy zostanie przerwana. W celu wyjaśnienia, czy w okresie formowania się tego rodzaju pamięci zachodzi indukcja genów odpowiedzi wczesnej, przeprowadzono kilka eksperymentów. W pierwszym eksperymencie samice umieszczano w klatce z samcami. W różnych odstępach po kopulacji samice wyjmowano z klatki, zabijano a ich mózgi poddawano analizie. W drugim eksperymencie sprawdzono wpływ samych feromonów samców myszy wkładając samice do pustej domowej klatki samców. W trzecim eksperymencie przed kontaktem z samcem zaklejano samicom jedno nozdrze. Nie wykryto istotnych różnic w ekspresji białek c-Fos i Egr-1 (inna nazwa Zif/268) w opuszce węchowej sa-

mic myszy w sytuacjach, w których nie dochodziło do krycia samic. Tylko ekspozycja na feromony samca, która była połączona z kryciem samic, doprowadzała do istotnego wzrostu indukcji c-Fos i Egr-1 w opuszce węchowej. Poziom ekspresji tych białek u samic eksponowanych na działanie feromonów samców połączone z kryciem samic także był istotnie większy w tej części opuszki węchowej, która nie została pozbawiona działania feromonów.

Na złożony charakter ekspresji genu *c-fos* w trakcie doświadczeń behawioralnych mogą wskazywać wyniki uwzględniające udział stresu, w tym i tak łagodnego, jak towarzyszącego tak zwanemu handlingowi w pobudzeniu ekspresji tego genu (CAMPEAU i współaut. 1991, MELIA i współaut. 1994).

EKSPRESJA *c-fos* W ZALEŻNOŚCI OD RÓŻNYCH STADIÓW TRENINGU BEHAWIORALNEGO

Czynnikiem utrudniającym interpretację opisanych powyżej doświadczeń nad ekspresją *c-fos*, wywołaną treningiem behawioralnym, jest częsty brak rozróżnienia pomiędzy okresem nabywania reakcji (ang. acquisition), czyli uczenia się a samą zdolnością do wykonywania reakcji (ang. performance). Testem behawioralnym, który pozwala na takie rozróżnienie jest nabywanie dwukierunkowej reakcji unikania w skrzynce wahadłowej w wersji zaproponowanej przez ZIELIŃSKIego i współautorów (1991).

Dwukierunkową reakcję unikania wytwarza się w klatce wahadłowej zbudowanej z dwóch przedziałów o podłodze składającej się z prętów metalowych oraz źródeł bodźców sygnalizacyjnych, na przykład światła i dźwięku. Zadaniem zwierzęcia jest uniknięcie bodźca bólowego US (bodziec bezwarunkowy, ang. unconditioned stimulus), najczęściej podawanego w postaci łagodnego szoku elektrycznego poprzez pręty podłogi aparatu treningowego. Aby uniknąć US, zwierzę musi przejść do drugiej części aparatu. Bodziec warunkowy CS (ang. conditioned stimulus), zwykle wzrokowy lub słuchowy, jest podawany kilka sekund przed zastosowaniem US. Mogą być obserwowane dwa rodzaje reakcji — reakcje unikania (ang. avoidance), wykonane pod wpływem CS przed włączeniem się US i reakcje ucieczki (ang. escape) wykonane pod wpływem działania bodźca bezwarunkowego.

Sesja treningowa składa się zwykle z kilkudziesięciu prób. Poddanie zwierzęcia przez kilka dni codziennemu (jedna sesja dziennie) treningowi prowadzi do stopniowego wyuczenia się reakcji unikania, której poziom wykonania po kilku sesjach osiąga plateau. W tym okresie można uznać, że zwierzę nauczyło się reakcji unikania i dalszy trening nie ma charakteru uczenia się.

Wiadomo także, że duży wpływ na poziom wykonania dwukierunkowej reakcji unikania ma modalność bodźca warunkowego. Bodziec słuchowy z reguły wywołuje wyższy poziom wykonania reakcji unikania w porównaniu z bodźcem wzrokowym. Jeśli zwierzętom, które przez kilka kolejnych dni były poddawane treningowi reakcji unikania na bodziec wzrokowy i osiągnęły stały poziom wykonania tej reakcji, dodać do bodźca wzrokowego bodziec słuchowy lub w ogóle zamienić go na bodziec słuchowy, to poziom wykonania reakcji unikania istotnie się podwyższy (ZIELIŃSKI i współaut. 1991).

Korzystając z takiego testu można zbadać i porównać ze sobą zmiany biochemiczne i molekularne zachodzące w komórkach nerwowych mózgu zwierząt i towarzyszące uczeniu się (okres od pierwszej sesji treningowej do osiągnięcia plateau), wykonywaniu już wyuczonej reakcji (kolejne sesje charakteryzujące się stałym poziomem wykonania reakcji) i ponownemu uczeniu się w obecności nowego (słuchowego) bodźca na tle już wyuczonej poprzednio reakcji na bodziec wzrokowy.

W tym celu zostało wykonanych kilka doświadczeń. W dwóch z nich, które były przeprowadzone w nieco innych warunkach, zbadano wpływ jednodniowej sesji treningowej w skrzynce wahadłowej na pobudzenie ekspresji genu *c-fos* w mózgu szczurów. W rezultacie tych doświadczeń wykazano istotny wzrost poziomu mRNA *c-fos* w hipokampie i korze wzrokowej zwierząt, zabitych w zakresie od 30 do 90 min od chwili rozpoczęcia treningu i całkowity brak wzrostu ekspresji tego genu w 6 i 24 godziny po treningu (NIKOLAEV i współaut. 1992a).

W następnym doświadczeniu podjęto próbę określenia, jaki wpływ na ekspresję genów ma wykonanie wyuczonej już reakcji unikania, w odróżnieniu od nabywania (uczenia się) tej reakcji. Celem wykluczenia możliwego efektu zaniku zdolności dalszego pobudzenia ekspresji *c-fos* w konsekwencji uprzedniego treningu (c-Fos jest negatywnym autoregulatorem własnego genu, patrz wyżej) zastosowano układ doświadczalny wprowadzony przez ZIELIŃSKIego i współpracowników (1991) a polegający na zmianie sytuacji bodźcowej po osiągnięciu stałego poziomu wykonania reakcji unikania. Zbadano ekspresję *c-fos* w trzech sytuacjach doświadczalnych: (i) u szczurów przebywających jedynie w klatkach domowych; (ii) u szczurów po dziewiątej sesji treningowej, podczas której zwierzę w wyniku zmiany bodźca warunkowego (dodanie szumu do ciemności) dodatkowo uczy się sprawnego wykonywania reakcji instrumen-

talnej, (iii) po dziewiątej sesji treningowej, w której nie następuje żadna zmiana bodźca warunkowego i zwierzę wykonuje jedynie dobrze wyuczoną reakcję. W wyniku tego doświadczenia stwierdzono znaczny wzrost ekspresji *c-fos* w korze czuciowej zwierząt w grupach (ii). Wykryto także podwyższony poziom mRNA *c-fos* w móżdżku zwierząt pochodzących z tych samych grup. Nie obserwowano wzrostu ekspresji genu *c-fos* w mózgu szczurów w grupach (i) i (iii) (NIKOLAEV i współaut. 1992b).

ZMIANY EKSPRESJI *c-fos* WYWOŁANE TRENINGIEM BEHAWIORALNYM — PODSUMOWANIE

Najważniejszym wynikiem uzyskanym w badaniach behawioralnych opisanych powyżej jest wykazanie, że przejściowe nagromadzanie się mRNA *c-fos* w różnych strukturach mózgu szczura towarzyszy nabywaniu, a nie wykonywaniu dwukierunkowej reakcji unikania. W szczególności stwierdzono, że pojedyncza sesja treningowa prowadzi do wzrostu ekspresji *c-fos* w mózgu zwierząt. Z kolei prowadzenie treningu do osiągnięcia plateau poziomu wykonania reakcji unikania i badanie ekspresji *c-fos* po sesji treningowej w tym okresie nie pozwoliło na wykrycie mRNA tego genu. Nie było to jednak spowodowane niezdolnością genu do ulegania ekspresji, ponieważ zmiana warunków doświadczenia (dodanie bodźca słuchowego do wzrokowego CS) wywołała nagromadzenie się badanego mRNA. Co więcej, zmiana jakości CS prowadziła także do wzrostu poziomu wykonania reakcji. Wiadomo również, że produkt białkowy c-Fos hamuje własną ekspresję na poziomie transkrypcji (EDWARDS 1994, ROBERTSON i współaut. 1995), dlatego nie można było wykluczyć niezdolności *c-fos* do ulegania pobudzeniu w wyniku długotrwałego treningu.

Powyżej podano kilka przykładów badań różnych autorów, wykazujących podobny wzrost poziomu białka lub mRNA *c-fos* w różniących się między sobą sytuacjach doświadczalnych opartych o zjawisko uczenia się. Mimo że niektórzy badacze podkreślali, że ekspresja tego genu wzrasta w wyniku wykonywania reakcji, to rezultaty wspomnianych doświadczeń nie wydają się być sprzeczne ze sobą. W szczególności trzeba podkreślić, że w pracach CASTRO-ALAMANCOSa i współautorów (1992), ROBERTSONa i współautorów (1991) oraz HESSa i współautautorów (1995) sesja testowa różniła się znacząco schematem doświadczenia od sesji treningowych, a zatem trudno określić ją mianem testu sprawdzającego jedynie wykonanie reakcji bez elementów nowości (ang. novelty).

Można znaleźć w piśmiennictwie przykłady badań, w których nie udało się stwierdzić zmian ekspresji genu *c-fos* w wyniku treningu, na przykład, wyniki doświadczeń WISDENA i współautorów (1990), w których używano basenu Morrisa. W badaniach tych nie wykryto zmian ekspresji zarówno *c-fos*, jak i innego czynnika transkrypcyjnego *zif/268*. Co ciekawe, nowsze prace wykorzystujące ten test wskazują jednak na towarzyszące treningowi zmiany poziomu mRNA *zif/268* (FORDYCE i współaut. 1994). Nie jest jednak jasne, czy zmiany te nie były efektem wzmożonej aktywności ruchowej (wymuszone pływanie).

Podsumowując te rozważania oparte o wyniki własne oraz innych autorów można stwierdzić, że w trakcie uczenia się występują zmiany ekspresji *c-fos*. Nie wiadomo jednak, jakie elementy treningu są za te zmiany odpowiedzialne. W szczególności znaczącą rolę może odgrywać stres towarzyszący treningowi. Warto pamiętać, że również pseudowarunkowanie (podawanie CS i US w sposób przypadkowy, uniemożliwiający kojarzenia ich ze sobą) powodował wzrost ekspresji badanego genu (TISCHMEYER i współaut. 1990).

Zagadnienie roli stresu w pobudzeniu *c-fos* było ostatnio intensywnie badane. MELIA i współpracownicy (1994) wykazali, że ostry stres polegający na pozbawieniu zwierząt swobody ruchu wywołuje bardzo wyraźny wzrost ekspresji genów odpowiedzi wczesnej, między innymi i *c-fos*, w różnych obszarach mózgu szczurów. Najbardziej wyraźny wzrost był obserwowany w hipokampie, a najmniejszy w ciele migdałowatym i w pniu mózgu, co było dla autorów pewnym zaskoczeniem. Stwierdzono również, że powtarzające się sesje unieruchomienia zwierząt doprowadzały do przyzwyczajenia zwierzęcia do sytuacji stresowej i przez to do zmniejszenia się stresu. Wyrażało się to w istotnym zmniejszeniu poziomu kortykosteronu w osoczu krwi po czwartej sesji i całkowitym powrocie poziomu hormonu do kontrolnego po dziewiątej sesji. Podobny charakter zmian wykazała ekspresja genu *c-fos* we wszystkich badanych strukturach. Co ciekawe, próba poddania szczurów już przyzwyczajonych do określonego rodzaju stresu (unieruchomienie) działaniu innego stresu (pływanie) doprowadzało do ponownego nagromadzenia się mRNA *c-fos* w każdej z badanych struktur mózgu. Warto jednak zwrócić uwagę, że w sytuacji poddawania zwierząt kolejnym zabiegom stresującym występował także

element uczenia się nowej sytuacji doświadczalnej. Stąd nie można z całą pewnością stwierdzić, że pobudzenie ekspresji *c-fos* jest spowodowane tylko i wyłącznie odpowiedzią organizmu zwierząt na działanie stresogenne.

Nieco inne wyniki otrzymali CHEN i HERBERT (1995) badając wpływ unieruchomienia zwierząt na ekspresję mRNA *c-fos* w warunkach doświadczenia pojedynczego i powtarzającego się. Wykazano, w przeciwieństwie do danych uzyskanych przez MELIĘ i współpracowników (1994), że poziom kortykosteronu u szczurów poddanych unieruchomieniu nie wracał całkowicie do wartości kontrolnych po dziesięciu kolejnych sesjach stresu i był istotnie wyższy od obserwowanego u szczurów kontrolnych (jedynie codzienne przeniesienia z pokoju domowego do doświadczalnego i z powrotem). Natomiast podtwierdzono spadek ekspresji *c-fos* po stresie powtarzającym się w porównaniu ze stresem pojedynczym.

Podobne wyniki uzyskali w innym doświadczeniu BECK i FIBIGER (1995). W eksperymencie tych badaczy szczury przez kilka kolejnych codziennych sesji treningowych przeprowadzonych w tym samym pokoju i w tej samej klatce doświadczalnej były poddawane działaniu bodźca bólowego (prąd elektryczny). W dniu testowym, który następował po dwudniowej przerwie, cała ta procedura doświadczalna została zachowana z tym, że bodziec bólowy nie był już zastosowany. W wyniku doświadczenia wykryto ekspresję białka c-Fos w wielu obszarach mózgu szczurów. Autorzy twierdzą, że zostało to spowodowano stresem wywołanym strachem na sytuację doświadczalną. Znowu jednak nie można wykluczyć uczenia się zwierząt sytuacji nowej, bo pozbawionej groźnego, dobrze znanego bodźca bólowego. I w tym przypadku można więc sugerować, że czynnikiem wywołującym wzrost ekspresji c-Fos w mózgu zwierząt było uczenie się.

Również CULLINAN i współapracownicy (1995) obserwowali wzrost ekspresji mRNA *c-fos* w wielu obszarach mózgu szczura po zmuszeniu zwierząt do pływania w basenie i po pozbawieniu ich swobody ruchu w doświadczeniu pojedynczego stresu.

Na podstawie przedstawionych wyników badań można by sądzić o dominującej roli procesów związanych ze stresem w aktywacji *c-fos* towarzyszącej treningowi behawioralnemu. Warto jednak przytoczyć wyniki innych badaczy (ANOKHIN i ROSE 1991, ANOKHIN i współaut. 1991), którzy uzyskali efekt lateralizacji ekspresji *c-fos* u kurcząt trenowanych w teście biernego unikania. Można by się spodziewać, że efekt stresu powinien dotyczyć obu półkul mózgu i nie być zakłócony poprzez zamknięcie jednego oka. Wynik tego doświadczenia przemawia zatem przeciwko prostemu „stresowemu" wyjaśnieniu mechanizmów wzbudzonej ekspresji *c-fos* w wyniki treningu behawioralnego.

Podobne wątpliwości co do roli stresu nasuwają wyniki BIAŁEGO i współautorów (1992). W badaniach tych stwierdzono nagromadzenie mRNA *c-fos* w korze czuciowej mózgu szczura w okresie nabywania zdolności kopulacyjnych przez samce. Co ciekawe, zjawisko wzrostu ekspresji genu nie wystąpiło po pierwszej sesji treningowej, kiedy można by było oczekiwać najwyższego poziomu pobudzenia nieswoistego (stresu). Efekt ten ujawnił się dopiero po 3–5 sesjach treningowych i następnie zanikał.

W doświadczeniach różnych autorów badających rolę stresu w pobudzeniu ekspresji *c-fos* dają się zauważyć elementy uczenia się, a przynajmniej odpowiedzi na nowość sytuacji doświadczalnej (ang. response to novelty). W żadnej bowiem z opisanych powyżej sytuacji tego zjawiska nie da się wykluczyć.

Podsumowując rozważania nad możliwymi czynnikami behawioralnymi odpowiedzialnymi za zwiększoną ekspresję *c-fos* w mózgu szczura w okresie uczenia się, można jedynie stwierdzić, że brak jest dotąd jednoznacznego wyjaśnienia tego zjawiska. Warto jednak podkreślić, że odpowiedź na nowość sytuacji doświadczalnej i dostęp do nowych bodźców czuciowych są jedynymi niekwestionowanymi wspólnymi elementami opisywanych doświadczeń.

c-Fos A PLASTYCZNOŚĆ NEURONALNA

Na koniec warto zadać pytanie o biologiczne znaczenie zwiększonej ekspresji *c-fos* w procesach plastyczności neuronalnej, w tym między innymi LTP i uczeniu się. Jedna możliwość to istnienie przypadkowej korelacji. Wiadomo, że procesom plastycznym towarzyszy zwiększona aktywność neuronalna i wiadomo też, że wiele form zwiększonej aktywności komórkowej koreluje z aktywacją genu *c-fos*. Znaczenie funkcjonalne tej korelacji nie jest dobrze wyjaśnione, choć trzeba pamiętać, że istnieją przykłady hamowania procesów fizjologicznych w wyniku selektywnego blokowania c-Fos (WATANABE i współaut. 1996).

Kolejne możliwe wyjaśnienie to konieczność uzupełnienia (replenishment) zawartości syna-

psy zużytej pod wpływem silnej stymulacji. Szczególnie wyraźne jest to w LTP (tetanizacja), ale podobnego zjawiska można także oczekiwać w trakcie warunkowania obronnego (KACZMAREK 1995). Inną zaś możliwością zaproponowaną przez KACZMARKA (1993) jest udział białka c-Fos, jako składnika czynnika transkrypcyjnego AP-1, w integracji informacji w procesach uczenia się. Zgodnie z tą propozycją powstawanie trwałej zmiany plastycznej (np. utworzenia długotrwałego śladu pamięciowego) wymaga pobudzonej ekspresji genów. Można by wśród nich wyróżnić także te, które kodują składniki synaptyczne, na przykład białka pęcherzyków (SMIRNOVA i współaut. 1993, LYNCH i współaut. 1994) lub też białka cytoszkieletu (WOOLF i współaut. 1994). Ich zwiększona obecność byłaby w myśl tej hipotezy warunkiem zwiększonej siły przekaźnictwa synaptycznego. Geny te, według KACZMARKA (1993), można by nazwać genami efektorowymi w procesie uczenia się. Ekspresja zaś genów efektorowych byłaby zależna od dostępności czynników transkrypcyjnych. Jeśli zaś poszczególne czynniki transkrypcyjne byłyby aktywowane w miarę specyficznie w następstwie pobudzenia swoistych układów neuroprzekaźnikowych, jednoczesna obecność czynników transkrypcyjnych byłaby informacją o w miarę jednoczesnym pobudzeniu określonych receptorów. W rezultacie jedynie współobecność wielu czynników transkrypcyjnych umożliwiałaby pobudzenie ekspresji genów efektorowych. Inaczej mówiąc, obszary regulatorowe tych ostatnich (miejsca oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi) stanowiłyby materialne podłoże procesu integracji informacji dostarczonej komórce nerwowej poprzez pobudzenie receptorów błonowych.

c-fos GENE ACTIVATION AS A PREDISPOSAL FOR PLASTIC CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Summary

Understanding of molecular basis of long term memory formation poses a major challenge for the present-day neurobiological research. Recent advances in molecular biology offer, however, a clue about molecular mechanisms of learning processes. Significant progress in this regard can be linked to studies on transcription factors including AP-1, and its component c-Fos. This protein by its virtue to affect expression of a variety of genes is recognized as a third messenger in the biochemical cascade transducing information from extracellular environment to genomic responses. This function, well described for non-neuronal cells, has been found to be pivotal in brain cells as well. Expression of *c-fos* mRNA and c-Fos protein remains very low under basal conditions. Stimulation of neurons with a variety of agents, especially involving receptors for excitatory amino acids, results in a rapid and transient increase in c-fos expression. A similar increase has been observed to correlate with different forms of neuronal plasticity, such as kindling, long term potentiation, postnatal cortical development, sensory stimulation, etc. The most intriguing are findings that behavioral training resulting in long term memory formation also coincides with elevated *c-fos* expression at mRNA and protein levels. The available data suggest that this increase can not be solely explained by such phenomena as locomotor activity, pain, stress, etc., but rather correlates with acquisition of behavioral experience and/or response to novelty.

LITERATURA

ABRAHAM W. C., MASON S. E., DEMMER J., WILLIAMS J. M., RICHARDSON C. L., TATE W. P., LAWLOR P. A., DRAGUNOW M., 1993. *Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation.* Neuroscience 56, 717–727.

ANGEL P., KARIN M., 1991. *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation.* Biochem. Biophys. Acta 1072, 129–157.

ANOKHIN K. V., ROSE S. P. R., 1991. *Learning-induced increase of immediate early gene messenger RNA in the chick forebrain.* Eur. J. Neurosci. 3, 162–167.

ANOKHIN K. V., MILEUSNIC R., SHAMAKINA I. Y., ROSE S. P. R., 1991. *Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain.* Brain Res. 544, 101–107.

BADING H., SEGAL M. M., SUCHER N. J., DUDEK H., LIPTON S. A., GREENBERG M. E. 1995. *N-methyl-D-aspartate receptors are critical for mediating the effects of glutamate on intracellular calcium concentration and immediate early gene expression in cultured hipocampal neurons.* Neuroscience 64, 653–664.

BAILEY C. H., KANDEL E. R., 1993. *Structural changes accompanying memory storage.* Annu. Rev. Physiol. 55, 397–426.

BARAŃSKA J., KACZMAREK L., SKANGIEL-KRAMSKA L., 1994. *Kaskada procesów biochemicznych po pobudzeniu neuronu.* [W:] *Mechanizmy plastyczności mózgu.* KOSSUT M. red. PWN Warszawa. 148–158.

BECK C. H. M., FIBIGER H. C., 1995. *Conditioned Fear-induced Changes in Behavior and in the Expression of the Immediate Early Gene c-fos, With and Without Diazepam Pretreatment.* J. Neurosci. 15, 709–720.

BIAŁY M., NIKOLAEV E., BECK J., KACZMAREK L., 1992. *Delayed c-fos expression in sensory cortex following sexual learning in male rats.* Mol. Brain. Res. 14, 352–356.

BIRDER L. A., DE-GROAT W. C., 1993. *Induction of c-fos expression in spinal neurons by nociceptive and nonnociceptive stimulation of LUT.* Am. J. Physiol. 265, 326–333.

BLISS T. V. P., COLLINGRIDGE G. L., 1993. *A synaptic model of memory, long-term potentiation in the hipokampus.* Nature 361, 31–39.

BLISS T. V. P., GARDNER-MEDWIN A. R., 1973. *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.* J. Physiol., London, 232, 357–374.

BLISS T. V. P., LOMO T. J., 1973. *Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.* J. Physiol., London 232, 331–356.

BRENNAN P. A., HANCOCK D., KEVERNE E. B., 1992. *The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice.* Neuroscience 49, 277–284.

BRUCE H. M., 1961. *Time relations in the pregnancy-block induced in mice by strange males.* J. Reprod. Fert. 2, 138–142.

CAMPEAU S., HAYWARD M. D., HOPE B. T., ROSEN J. B., NESTLER E. J., DAVIS M., 1991. *Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear.* Brain Res. 565, 339–352.

CASTRO-ALAMANCOS M. A., BORRELL J., GARCIA-SEGURA L. M., 1992. *Performance in an escape task induces fos-like immunoreactivity in a specific area of the motor cortex of the rat.* Neuroscience 49, 157–162.

CHEN S., HILLMAN D. E., 1992. *Transient c-fos expression and dendritic spine plastycity in hippocampal granule cells.* Brain Res. 577, 169–174.

CHEN X., HERBERT J., 1995. *Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress, correlations with cardiovzscular, hypothermic and endocrine responses.* Neuroscience 64, 675–685.

CLARK M., POST R. M., WEISS S. R., NAKAJIMA T., *1992. Expression of c-fos mRNA in acute and kindled coCaine* seizures in rats. Brain Res. 582, 101–106.

CLARK M., POST R. M., WEISS S. R., CAIN C.J., NAKAJIMA T. 1991. *Regional expression of c-fos mRNA in rat brain during the evolution of amygdala kindled seizures.* Mol. Brain Res. 11, 55–64.

COLE A. J., SAFFEN D. W., BARABAN J. M., WORLEY P. F., 1989. *Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation.* Nature 340, 474–476.

COLLINGRIDGE G. L., SINGER W., 1990. *Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity.* Trends Pharmacol. Sci. 11, 290–296.

CONDORELLI D. F., DELL'ALBANI P., AMIKO C., KACZMAREK L., NICOLETTI F., LUKASIUK K., GIUFFRIDA-STELLA A. M., 1993. *Induction of primary response genes by excitatory amino acids receptor agonists in primary astroglial cultures.* J. Neurochem. 60, 877–885.

CONDORELLI D.F., DELL'ALBANI P., AMIKO C., LUKASIUK K., KACZMAREK L., GIUFFRIDA-STELLA A. M., 1994. *Glutamate receptor-driven activation of transcription factors in primary neuronal cultures.* Neurochem. Res. 19, 489–499.

CONDORELLI D. F., KACZMAREK L., NICOLETTI F., ARCIDIACONO A., DELL'ALBANI P., INGRAO F., MAGRI G., MALAGUARNERA L., AVOLA R., MESSINA A., 1989. *Induction of protooncogene fos by extracellular signals in primary glial cell cultures.* J. Neurosci. Res. 23, 234–239.

CULLINAN W. E., HERMAN J. P., BATTAGLIA D., AKIL H., WATSON S. J., 1995. *Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain folloeing acute stress.* Neuroscience 64, 477–505.

CURRAN T., MORGAN J. I., 1985. *Superinduction of fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines.* Science 229, 1265–1268.

CURRAN T., MORGAN J. I., 1987. *Memories of fos.* BioEssays 7, 255–258.

CURRAN T., TEICH N. M., 1982. *Identification of a 39,000 dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus.* Virology 116, 221–235.

DEMMER J., DRAGUNOW M., LAWLOR P. A., MASON S., LEAH J. D., ABRAHAM W. C., TATE W. P., 1993. *Differential expression of immediate early genes after hippocampal long-term potentiation in awake rats.* Mol. Brain Res. 17, 279–286.

DRAGUNOW M., ROBERTSON H. A., 1987. *Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus.* Nature 329, 441–442.

DRAGUNOW M., ABRAHAM W. C., GOULDING M., MASON S. E., ROBERTSON H. A., FAULL R. L., 1989. *Long-term potentiation and the induction of c-fos mRNA and proteins in the dentate gyrus of unanesthetized rats.* Neuroscience Letters. 101, 274–280.

EDWARDS D. R., 1994. *Cell signalling and the control of gene transcription.* TiPS. 15, 239–244.

FAGGIOLINI M., PIZZORUSSO T., BERARDI N., DOMENICI L., MAFFEI L., 1994. *Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience, dark rearing amd monocular deprivation.* Vision Res. 34, 709–720.

FORDYCE D. E., BHAT R. V., BARABAN J. M., WEHNER J. M., 1994. *Genetic and activiti-dependent regulation of zif/268 expression, association with spatial learning.* Hippocampus 4, 559–568.

FREY U., KRUG M., REYMANN K. G., MATTHIES H., 1988. *Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in th e hippocampal CA1-region in vitro.* Brain Research. 452, 57–65.

GIRI P. R., DAVE J. R., TABAKOFF B., HOFFMAN P. L., 1990. *Arginine vasopressin induces the expression of c-fos in the mouse septum and hipocampus.* Mol. Braim Res. 7, 131–137.

GREENE L. A., TISCHLER A., 1982. *PC12 cultures in neurobiological research.* Adv. Cell. Neurobiol. 3, 373–414.

GREENBERG M. E., GREENE L. A., ZIFF E. B., 1985. *Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells.* J. Biol. Chem. 260, 14101–14110.

GREENBERG M. E., ZIFF E. B., GREENE L. A., 1986. *Stimulation of neuronal acetylocholine receptors induces rapid gene transription.* Science 234, 80–83.

GŁAŻEWSKI S., 1992. *Udział receptorów dla glutaminianu w procesach ośrodkowego układu nerwowego. Fakty i hipotezy.* [W:] *Pobudzające aminokwasy.* IX Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 1992, PILC A., (red.) 41–53.

HERDEGEN T., SANDKUHLER J., GASS P., KIESSLING M., BRAVO R., ZIMMERMAN M., 1993. *JUN, FOS, KROX, and CREB transcription factor proteins in the rat cortex, basal expression and induction by spreading depression and epileptic seizures.* J. Comp. Neurol. 333, 271–288.

HERRERA D. G., ROBERTSON H. A., 1989. *Unilateral induction of c-Fos protein in cortex following cortical devascularization.* Brain Res. 503, 205–213.

HERRERA D. G., ROBERTSON H. A., 1990a. *Application of potassium chloride to the brain surfase induced the c-fos protooncogene, reversal by MK-801.* Brain Res. 510, 166–170.

HERRERA D. G., ROBERTSON H. A., 1990b. *N-methyl-D-aspartate receptors mediate activation of the c-fos protooncogene in a model of brain injury.* Neuroscience 35, 273–281.

HESS U. S., LUNCH G., GALL C. M., 1995. *Changes in c-fos mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning, differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3.* J. Neurosci. 15, 4786–4795.

HEURTEAUX C., MESSIER C., DESTRADE C., LAZDUNSKI M., 1993. *Memory processing and apamin induce immediate early gene expression in mouse brain.* Mol. Brain Res. 3, 17–22.

HUANG Y.-Y., LI X.-C., KANDEL E. R., 1994. *cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase.* Cell 79, 69–79.

HUBEL D. H., WIESEL T. N., LEVAY S., 1977. *Plasticity of ocular dominance in monkey striate cortex.* Philos. Trans. Roy. Soc. London Ser. B. 278, 377–409.

HUNT S. P., PINI A., EVAN G., 1987. *Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation.* Nature 328, 632–634.

IMAKI T., SHIBASAKI T., HOTTA M., DEMURA H., 1993. *Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses, comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress.* Brain Res. 616, 114-125.

JEFFREY K. J., ABRAHAM W. C., DRAGUNOW M., MASON S. E., 1990. *Induction of Fos-like immunoreactivity and the maintenance of long term potentiation in the dentate gyrus of unanesthetized rats.* Mol. Brain Res. 8, 267–274.

KACZMAREK L., 1992. *Expression of c-fos and other genes encoding transcription factors in long term potentiation.* Behav. Neural. Biol. 57, 263–266.

KACZMAREK L., 1993. *Molecular biology of Vertebrate learning, Is c-fos a new beginning?* J. Neurosci. Res. 34, 377–381.

KACZMAREK L., 1994. *Glutamate-evoked gene expression in brain cells — Focus on transcription factors.* Amino Acids. 7, 245–254.

KACZMAREK L., 1995. *Towards understanding a role of transcription factors in learning processes.* Acta Biochim. Polon. 42, 221–226.

KACZMAREK L., HHAUDHURI A., 1997. *Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex, implications for functional mapping and neural plasticity.* Brain Res. Rev. W druku.

KACZMAREK L., KAMIŃSKA B., 1989. *Molecular biology of cell activation.* Exp. Cell Res. 183, 24–35.

KACZMAREK L., SIEDLECKI J. A., DANYSZ W., 1988. *Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus.* Mol. Brain Res. 3, 186–188.

KAMIŃSKA B., FILIPKOWSKI R. K., ŻURKOWSKA G., LSOŃ W., PRZEWLOCKI R., KACZMAREK L., 1994. *Dynamic changes in composition of the AP-1 transcription factor DNA binding activity in rat brain following kainate induced seizures and cell death.* Eur. J. Neurosci. 6, 1558–1566.

KAMIŃSKA B., KACZMAREK L., HHAUDHURI A., 1996. *Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in visual cortex.* J. Neurosci. 16, 3968–3978.

KAMIŃSKA B., MOSIENIAK G., GIERDALSKI M., KOSSUT M., KACZMAREK L., 1995. *Elevated AP-1 transcription factor dna binding activity at the onset of functional plasticity during development of rat sensory cortical areas.* Mol. Brain Res. 33, 295–304.

KANDEL E. R., O'DELL T. J., 1992. *Are adult learning mechanisms also used for development?* Science 258, 243–245.

KAPLAN I. V., GUO Y. H., MOWER G. D., 1996. *Immediate early gene expression in cat visual cortex during and after the critical period-differences between EGR-1 and fos proteins.* Mol. Brain Res. 36, 12–22.

KIESSLING M., STUMM G., XIE Y., HERDEGEN T., AGUZZI A., BRAVO R., GASS P., 1993. *Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia.* J. Cereb. Blood Flow. Metab. 13, 914–924.

KLEINSCHMIDT A., BEAR M. F., SINGER W., 1987. *Blockade of „NMDA" receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten cortex.* Science 238, 355–358.

KONORSKI J., 1948. *Conditioned reflexes and neuron organization.* Cambridge University Press. Cambridge. 267.

KOSSUT M., red. 1994. *Mechanizmy plastyczności mózgu.* PWN Warszawa. 9–246.

KRUG M., LOESSNER B., OTT T., 1984. *Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats.* Brain Res. Bul. 13, 39–43.

KRUG M., WAGNER M., BRODEMANN R., MATTHIES H., 1989. *Habituation of monosynaptic field potentials in the dentate gyrus of freely moving rats interferes with LTP.* Brain Res. 476, 163–166.

KRUIJER W., SCHUBERT D., VERMA I. M., 1985. *Induction of the proto-oncogene fos by nerve growth factor.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7330–7334.

LABINER D. M., BUTLER L. S., CAO Z., HOSFORD D. A., SHIN C., MCNAMARA J. O., 1993. *Induction of c-fos mRNA by kindled seizures, complex relationship with neuronal burst firing.* J. Neurosci. 13, 744–751.

LE GAL LA SALLE G., 1988. *Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus.* Neurosci. Lett. 88, 127–130.

LUKASIUK K., KACZMAREK L., 1994. *AP-1 and CRE DNA binding activities in rat brain following pentylenetetrazole induced seizures.* Brain Res. 643, 227–233.

LYNCH M. A., VOSS K. L., RODRIGUEZ J., BLISS T. V., 1994. *Increase in synaptic vesicle proteins accompanies long-term potentiation in the denTATE* gyrus. Neuroscience 60, 1–5.

MACDERMOTT A. D., DALE N., 1987. *Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids.* Trends Neurosci. 10, 280–284.

MAGGIO R., LANAUT P., GRAYSON D. R., GALE K., 1993. *Expression of c-fos mRNA following seizures evoked from an epileptogenic site in the deep prepiriform cortex, regional distribution in brain as shown by in situ hybridization.* Exp. Neurol. 119, 11–19.

MATTHIES H., 1989a. *Neurobiological aspects of learning and memory.* Ann. Rev. of Psych. 40, 381–404.

MATTHIES H., 1989b. *In search of cellular mechanisms of memory.* Progr. Neurobiol. 32, 277–349.

MAYER M. L., WESTBROOK G. L., 1987. *The phiziolody of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system.* Prog. Neurobiol. 28, 197–276.

MCCORMACK M., ROSEN K. M., VILLA-KOMAROFF L., MOWER G. D., 1992. *Changes in immediate early gene expression during P*ostnatal development of cat cortex and cerebellum. Mol. Brain Res. 12, 215–223.

MELIA K. R., RYABININ A. E., SCHROEDER R. S., BLOOM F. E., WILSON M. C., 1994. *Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restrant stress.* J. Neurosci. 14, 5929–5938.

MOLANDER C., HONGPAISAN J., GRANT G., 1992. *Changing pattern of c-Fos expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat.* Neuroscience 50, 223–236.

MORGAN J. I., COHEN D. R., HEMPSTEAD J. L., CURRAN T., 1987. *Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure.* Science 237, 192–197.

MORGAN J. I., CURRAN T., 1986. *Role of ion fluxes in the control of c-fos expression.* Nature 322, 552–555.

MORGAN J. I., CURRAN T., 1991a. *Stimulus-transcription coupling in the nervous system, involvement of the inducible protooncogenes fos and jun.* Ann. Rev. Neurosci. 14, 421–451.

MORGAN J. I., CURRAN T., 1991b. *Proto-oncogene transcription factors and epilepsy.* Trends Pharmacol. Sci. 12, 343–349.

MORGAN P. F., LINNOILA M., 1991. *Regional induction of c-fos mRNA by NMDA, a quantitative in-situ hybridization study.* Neuroreport 2, 251–254.

MOWER G. D., 1994. *Differences in the induction of Fos protein in cat visual cortex during and after the critical period.* Mol. Brain Res. 21, 47–54.

MURPHY T. H., WORLEY P. F., BARABAN J. M., 1991b. *L-type voltage- sensitive calcium channels mediate synaptic*

activation of immediate early genes. Neuron. 7, 625–635.

MURPHY T. H., WORLEY P. F., NAKABEPPU Y., CHRISTY B., GASTEL J., BARABAN J. M., 1991a. *Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons.* J. Neurochem. 57, 1862–1872.

NHUYEN P.T., ABEL T., KANDEL E. R., 1994. *Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP.* Science 265, 1104–1107.

NIKOLAEV E., KAMINSKA B., TISCHMEYER W., MATTHIES H., KACZMAREK L., 1992a. *Induction of expression of genes encoding transcription factors in rat brain elicited by behavioral training.* Brain Res. Bull. 28:479–482.

NIKOLAEV E., WERKA T., KACZMAREK L., 1992b. *c-fos protooncogene expression in rat brain after long term training of two-way active avoidance reaction.* Behav. Brain Res. 48, 91–94.

NIKOLAEV E., TISCHMEYER W., KRUG M., MATTHIES H., KACZMAREK L., 1991. *c-fos protooncogene expression in rat hipokampus and entorhinal cortex following tetanic stimulation of the perforant path.* Brain Res. 560, 346–349.

NOWAK L., BREGESTOVSKI P., ASCHER P., HERBET A., PROCHIANTZ T., 1984. *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones.* Nature 307, 462–465.

NOWAK T. S., IKEDA J., NAKAJIMA T., 1990. *70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia.* Stroke 21, 107–111.

OTANI S., ABRAHAM W. C., 1989. *Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus, but not the entorhinal cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats.* Neuroscience Lett. 106, 175–180.

PENNYPACKER K. R., WALCZAK D., THAI L., FANNIN R., MASON E., DOUGLASS J., HONG J.S., 1993. *Kainate-induced changes in opioid peptide genes and AP-1 protein expressionin rat hippocampus.* J. Neurochem. 60, 204–211.

POPOVICI T., REPRESA A., CREPEL V., BARBIN G., BEAUOIN M., BEN-ARI Y., 1990. *Effects of kainic acid-induced seizures annd ischemia on c-fos-like proteins in rat brain.* Brain Res. 536, 183–194.

ROBERTSON G. S., PFAUS J. G., ATKINSON L. J., MATSAMURA H., PHILIPS A. G., FIBIGER H. H., 1991. *Sexual behavior increases c-fos expression in the forebrain of the male rat.* Brain Res. 564, 352–357.

ROBERTSON H. A., PAUL M. L., MORATALLA P., GRAYBIEL A. M., 1991. *Expression of immediate early gene c-fos in basal ganglia, induction by dopaminergic drugs.* Can. J. Neurol. Sci. 18, 380–383.

ROBERTSON L. M., KERPPOLA T. K., VENDRELL M., LUK D., SMEYNE R. J., BOCHIARO C., MORGAN J. I., CURRAN T., 1995. *Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements.* Neuron 14, 241–252.

ROSEN K. M., MCCORMACK M. A., VILLA-KOMAROFF L., MOWER G.D., 1992. *Brief visual experience induces immediate early gene expression in the cat visual cortex.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 5437–5441.

SAKURAI-YAMASHITA Y., SASSONE-CORSI P., GOMBOS G., 1991. *Immunohistochemistry of c-fos in mouse brain during postnatal development, basal levels and changing response to metrazol and kainate injection.* Eur. J. Neurosci. 3, 764–770.

SCHREIBER S. S., MAREN S., TOCCO G., SHORS T.J., THOMPSON R.F., 1991. *A negative correlation between the induction of long-term potentiation and activation of immediate early genes.* Mol. Brain Res. 11, 89–91.

SENBA E., MATSUNAGA K., TOHYAMA M., NOGUCHI K., 1993. *Stress-induced c-fos expression in the rat brain, activation machanism of sympathetic pathway.* Brain Res. Bull. 31, 329–344.

SHEHAB S., COFFEY P., DEAN P., REDGRAVE P., 1993. *Regional expression of fos-like immunoreactivity following seizures induced by pentylenetetrazole and maximal electroshock.* Exp. Neurol. 118, 261–274.

SIEROCIŃSKA J., NIKOLAEV E., DANYSZ W., KACZMAREK L., 1991. *Dextrorphan blocks long- but not short-term memory in a passive avoidance task in rats.* Eur. J. Pharmacol. 205, 109–111.

SIMONATO M., HOSFORD D. A., LABINER D. M., SHIN C., MANSBACH H. H., MCNAMARA J.O., 1991. *Differential expression of immediate early genes in the hipocampus in the kindling model of epilepsy.* Mol. Brain Res. 11, 115–124.

SMIRNOVA T., LAROCHE S., ERRINGTON M. L., HICKS A. A., BLISS T. V. P., MALLET J., 1993. *Transsynaptic expression of a presynaptic glutamate receptors during hippocampal long-term potentiation.* Science 62, 433–436.

SONNENBERG J. L., MACGREGOR-LEON P. F., MORGAN J. I., CURRAN T., 1989a. *Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure.* Neuron. 3, 359–365.

SONNENBERG J. L., MITCHELMORE C., MACGREGOR-LEON P. F., HEMPSTEAD J., MORGAN J. I., CURRAN T., 1989b. *Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain.* J. Neurosci. Res. 24, 72–80.

SZEKELY A. M., BARBACCIA M. L., ALHO H., COSTA E., 1989. *In primary cultures of cerebellar granule cells the activation of N-methyl-D-aspartate — sensitive glutamate receptors induces c-fos mRNA expression.* Mol. Pharmacol. 35, 401–408.

SZEKELY A. M., BARBACCIA M. L., COSTA E., 1987. *Activation of specific glutamate receptor subtypes increases c-foc proto-oncogene expression in primary cultures of cerebellar granule cells.* Neuropharmacolgy 26, 1779–1782.

SZEKELY A. M., COSTA E., GRAYSON D. R., 1990. *Transcriptional program coordination by N-methil-D-aspartate--sensitive glutamate receptor stimulation in primary cultures of cerebellar neurons.* Mol. Pharmacol. 38, 642–633.

TESKEY G. C., ATKINSON B. G., CAIN D. P., 1991. *Expression of the proto-oncogene c-fos following electrical kindling in the rat.* Mol. Brain Res. 11, 1–10.

TISCHMEYER W., GRIMM R., SCHICKNICK H., BRYSCH W., SCHLIENGENSIEPEN K.-H., 1994. *Sequence-specific impairment of learning by c-jun antisense oligonucleotides.* NeuroReport. 5, 1501–1504.

TISHMEYER W., KACZMAREK L., STRAUSS M., JORK R., MATTHIES H., 1990. *Accumulation of c-fos mRNA in rat hippocampus during acquisition of a brightness discrimination.* Behav. Neural. Biol. 54, 165–171.

VACCARINO F. M., HAYWARD M. D., NESTLER E. J., DUMAN R. S., TALLMAN J. F., 1991. *Differential induction of immediate early genes by excitatory amino acid receptors types in primary cultures of cortical and striatal neurons.* Mol. Brain. Res. 12, 233–241.

VENDRELL M., PUJOL M.J., TUSELL J. M., SERRATOSA J., 1992a. *Effect of different convulsants on calmodulin levels and proto-oncogene c-fos expression in the central nervous system.* Brain Res. Mol. Brain Res. 14, 285–292.

VENDRELL M., TUSELL J. M., SERRATOSA J., 1992b. *Effect of gamma-hexachlorocyclohexane and its isomers on proto-oncogene c-fos expression in brain.* Neurotoxicology 13, 301–308.

WATANABE Y., JOHNSON R. S., BUTLER R. S., BINDER D. K., SPIEGELMAN B. M., PAPAIOANNOU V. E., MCNAMARA J. O., 1996. *Null Mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy.* 16, 3827–3836.

WELSH F. A., MOYER D. J., HARRIS V. A., 1992. *Regional expression of heat shock protein-70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 12, 204–212.

WISDEN W., ERRINGTON M. L., WILLIAMS S., DUNNET S. B., WATERS C., HITCHCOCK D., EVAN G., BLISS T. V. P., HUNT S.P., 1990. *Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord.* Neuron 4, 603–614.

WOOLF N. J., YOUNG S. L., JOHNSON G. V. W., FANSELOW M. S., 1994. *Pavlovian conditioning alters cortical microtubule-associated protein-2.* NeuroReport. 5, 1045–1048.

WORLEY P. F., HRISTY A., NAKABEPPU Y., BHAT R. V., COLE A. J., ARABAN J. M., 1991. *Constitutive expression of zif/268 in neocortex is regulated by synaptic activity.* Proc. Natl. Acad. Sci. SA. 88, 5106–5110.

WORLEY P. F., BHAT V., BARABAN J. M., ERICKSON C. A., MCNAUGHTON B. L., BARNES K. A., 1993. *Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus, correlation with long-term enhancement.* J. Neurosci. 13, 4776–4786.

WORLEY P. F., COLE A. J., MURPHY T. H., CHRISTY B. A., NAKABEPPU Y., BARABAN J. M., 1990. *Synaptic regulation of immediate-early genes in brain.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 40, 213–223.

ZHU X. O., BROWN M.., MCCABE B. J., AGGLETON J.P., 1995. *Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain.* Neuroscience 69, 821–829.

ZIELIŃSKI K., red. 1993. *Mózg i mechanizmy przystosowawcze ustroju.* Kosmos 42, 201–506.

ZIELIŃSKI K., WERKA T., NIKOLAEV E., 1991. *Intertrial responses of rats in two-way active avoidance learning to visual and auditory stimuli.* Acta Neurobiol. Exp. 51, 71–78.

ŻERNICKI B., 1994. *Plastyczność mózgu — uwagi wstępne.* [W:] *Mechanizmy plastyczności mózgu.* KOSSUT M. (red.) PWN Warszawa. 9–14.