



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biologii

Neurobiologia

**Przestrzenna analiza zmian w ekspresji genów
wywołanych podaniem rysperydonu w korze
przedczołowej i prążkowie myszy**

Praca magisterska
wykonana pod opieką
dr hab. Jana M. Rodrigueza Parkitny
w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Kraków 2021

Pragnę podziękować promotorowi dr. hab. Janowi Rodriguezowi Parkitnie za pokazanie mi świata neurobiologii i genetyki molekularnej oraz inspirowanie do ciągłego rozwoju naukowego. Dziękuję za stworzenie możliwości przeprowadzenia niniejszych badań oraz za wsparcie na każdym ich etapie - od projektu eksperymentu po analizę jego wyników.

Chciałabym też podziękować mgr Annie Radlickiej za wsparcie radą, wiedzą, i umiejętnościami oraz za wszystkie godziny wprowadzania mnie w arkana pracy laboratoryjnej i dobrą atmosferę współpracy, którą tworzy wokół siebie.

Pamięci mojej Mamy. Dziękuję za spokój, wiarę we mnie i inspirowanie do spełniania marzeń, odkrywania świata oraz siebie samej.

Spis treści

Spis treści.....	3
Streszczenie	4
Abstract.....	5
Wykaz skrótów	6
1. Wstęp.....	7
2. Cele.....	16
3. Materiały i metody	16
3.1 Zarys metody przestrzennej analizy transkrypcji.....	16
3.2 Zwierzęta.....	18
3.3 Podania leku	18
3.4 Preparacja tkanki.....	19
3.5 Izolacja i ocena jakości RNA.....	19
3.6 Utrwalanie w metanolu i barwienie hematoksyliną i eozyną.....	20
3.7 Obrazowanie	21
3.8 Permeabilizacja	22
3.9 Odwrotna transkrypcja	22
3.10 Synteza drugiej nici cDNA i denaturacja.....	23
3.11 Amplifikacja i oczyszczanie cDNA przy użyciu SPRIselect.....	23
3.12 Konstrukcja bibliotek z kodami pozycyjnymi	25
3.13 Sekwencjonowanie bibliotek	29
4. Wyniki	30
4.1 Przygotowanie bibliotek do transkryptomiki przestrzennej.....	30
4.2 Wyniki sekwencjonowania	33
5. Dyskusja	43
6. Bibliografia.....	48

Streszczenie

Dynamiczna regulacja procesu ekspresji genów w komórkach jest kluczowa dla utrzymania homeostazy. W warunkach fizjologicznych ekspresja genów jest nierozdzielnie związana z funkcją i położeniem komórek w obrębie tkanek i narządów.

Celem badania była weryfikacja użyteczności nowej metody - transkryptomiki przestrzennej do badania w mózgu myszy wzorów ekspresji genów swoistych dla leków antypsychotycznych. W niniejszej pracy wdrożono metodykę transkryptomiki przestrzennej Visium Spatial Gene Expression (10x Genomics) do badania przestrzennej ekspresji genów. Najpierw zoptymalizowano sposób preparowania mózgów, czasy barwienia i permeabilizacji tkanki oraz warunki syntezy bibliotek. Następnie przeprowadzono główny eksperyment z udziałem 4 myszy C57BL/6, z których 2 otrzymały pojedynczą dawkę antypsychotycznego leku - rysperydonu. Do syntezy bibliotek cDNA użyto czołowych skrawków zawierających korę przedczołową i jądra podstawy.

W wyniku sekwencjonowania bibliotek zidentyfikowano ~6,500 genów na „punkt” w tkance. Profile transkrypcyjne poddano analizie skupień metoda k-średnich, a wyniki przedstawiono przy użyciu schematu t-SNE, który ujawnił wyraźnie rozdzielne od siebie klastry. Zestawienie wyników analizy skupień ze schematami budowy mózgu z atlasu Paxinosa i Franklina (2001) oraz zdjęciami wybarwionych skrawków wykazało, że skupienia odpowiadają podziałowi neuroanatomicznemu mózgu myszy. Poszczególne geny specyficzne dla różnych struktur mózgu również wykazywały wzorce ekspresji odpowiadające regionom tych struktur i klastrów, które je obejmowały. Zaobserwowano także lokalną ekspresję indukowaną rysperydonem w profilach ekspresji wybranych genów (*Egr1*, *Fos*, *Homer1* i *Sgkl*). Ponadto przeprowadzono próbę różnicowej ekspresji genów w celu zbadania wpływu rysperydonu. Jednakże analiza wpływu leku na zmiany transkryptomyczne będzie prawdopodobnie wymagać porównania średniej liczby zliczeń danego transkryptu między poszczególnymi klastrami lub punktami. Z uwagi na niewielką liczbę zwierząt w badaniu pilotażowym nie została przeprowadzona analiza statystyczna efektów działania rysperydonu.

Przedstawione w niniejszej pracy badanie potwierdza efektywne wykorzystanie opisanej metodologii. Uzyskane wyniki sugerują, że transkryptomika przestrzenna jest wysoce obiecującą metodą badania różnic w budowie neuroanatomicznej, a potencjalnie także różnic w sygnaturach transkrypcyjnych indukowanych lekami.

Abstract

Dynamic regulation of gene expression is crucial for maintaining cell homeostasis. Under physiological conditions, gene expression is inextricably linked with the function and location of cells within tissues and organs.

The aim of the study was to verify the effectiveness of the novel method - spatial transcriptomics in studying the patterns of gene expression specific for antipsychotic drugs in mouse brain. In presented work, I have used Visium Spatial Gene Expression (10x Genomics) spatial transcriptomics to assess spatial gene expression. To implement the method, I have first optimized the procedures for brain preparation, tissue staining and permeabilization times as well as library synthesis conditions. Then, the main experiment was performed on 4 C57BL/6 mice, 2 of them treated with a single dose of the antipsychotic drug risperidone. cDNA libraries were constructed from coronal sections that included the prefrontal cortex and basal ganglia.

Sequencing of the libraries identified ~6,500 genes per tissue “spot” area. Transcription profiles were clustered using the k-means method, and results were visualized using t-SNE scheme, that revealed clearly separated clusters. Results of the cluster analysis juxtaposed with the brain structure schemes from Paxinos and Franklin atlas (2001) and microphotographs of the stained sections showed that the clusters organisation corresponded to the neuroanatomical division of the mouse brain. Individual genes specific for different brain structures also showed expression patterns that corresponded to regions of these structures and the clusters that included them. Local expression induced by risperidone was also observed in the expression profiles of selected genes (*Egr1*, *Fos*, *Homer1* and *Sgkl*). Moreover trial of differential gene expression was performed to examine the effects of risperidone. However, analysis of the drug effect on transcriptomic changes will probably require a comparison of the mean count of a given transcript between individual clusters or spots. Due to the small number of animals in the pilot study, statistical analysis of risperidone effects was not performed.

The research presented in this thesis confirm the effective use of the described methodology. The obtained results suggest that spatial transcriptomics is a highly promising method to explore differences in neuroanatomical structure and potentially also differences in drug-induced transcriptional signatures.

Wykaz skrótów

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
DSP	Digital Spatial Profiling	Cyfrowe profilowanie przestrzenne
EPS	Extrapyramidal Side Effects	Pozapiramidowe skutki uboczne
IEG(s)	Immediate-Early Gene(s)	Gen(y) wczesnej odpowiedzi komórkowej
LCM	Laser Capture Microdissection	Laserowe pozyskiwanie mikroskrawków
NGS	Next-Generation Sequencing	Sekwencjonowanie nowej generacji
PER1	Period circadian regulator 1	Białko regulatorowe zegara okołodobowego Per1
RNAseq	(bulk) RNAseq	(masowe) RNAseq
scRNAseq	single cell RNA sequencing	Sekwencjonowanie pojedynczych komórek
RIN	RNA Integrity Number	Indeks spójności RNA
SGA	Second Generation Antipsychotics	Leki antypsychotyczne drugiej generacji
SSC	Saline-Sodium Citrate buffer	Bufor sól fizjologiczna-cytrynian sodu
SNP	Single nucleotide polymorphism	Polimorfizm pojedynczego nukleotydu
t-SNE	t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding	Stochastyczne porządkowanie sąsiadów w oparciu o rozkład t
UMI	Unique Molecular Identifier	Unikalny identyfikator molekularny

W wykazie nie uwzględniono skrótów od nazw genów, gdyż są one rozwijane w nawiasie przy pierwszym wprowadzeniu skrótu lub nazwy genu, a zastosowana nomenklatura jest zgodna z zasadami i wytycznymi ustanowionymi przez Międzynarodowy Komitet Standaryzowanej Nomenklatury Genetycznej dla Myszy (www.informatics.jax.org/mgihome/nomen).

1. Wstęp

Idea badania ekspresji genów w mózgu, jako potencjalnego substratu dla funkcjonowania umysłu i procesów poznawczych w warunkach fizjologicznych i chorobowych, swój początek bierze z odkrycia dokonanego przez Kandelą i Spencera (1968). Wykazali oni, że aktywność neuronalna podczas uczenia się, oprócz bezpośrednich zmian w neurotransmisji i zachowaniu, prowadzi do zmian w poziomie ekspresji genów, które pociągają za sobą zmiany w budowie całych sieci neuronalnych. Kodowanie w pamięci krótkotrwałej opiera się na modyfikacjach dotychczas istniejących białek, co prowadzi do zmian w połączeniach synaptycznych, ale tworzenie nowych synaps wymaga indukowania ekspresji genów i syntezy białek *de novo* (Goelet et al., 1986). Badania na poziomie komórkowym i molekularnym wskazują, że zależna od doświadczenia modulacja siły i struktury synaptycznej jest podstawowym i konserwatywnym ewolucyjnie mechanizmem, za pomocą którego wspomnienia są kodowane i przechowywane zarówno pamięci proceduralnej jak i deklaratywnej (Kandel, 2001; Schafe et al., 2001; Barco, Bailey i Kandel, 2006). Badania te pozwoliły połączyć modyfikację zachowania z neuroplastycznością, której podłożem są zmiany w ekspresji genów (Kandel, 2001). Wzajemny wpływ aktywności synaptycznej na poziom ekspresji genów i zmiany plastyczności synaptycznej można ująć jako pętlę sprzężenia zwrotnego. Regulacja ta zachodzi nie tylko w procesie uczenia się ale również wskutek zmian aktywności wywołanych działaniem innych bodźców zewnętrznych (McClung i Nestler, 2008).

Za efekty działania leków psychotropowych przynajmniej w części odpowiada wywierany przez nie wpływ na modulację ekspresji genów (Gunther i Gerwien, 2004). Jednak pomimo szeroko rozpowszechnionego użycia tego rodzaju leków w psychiatrii, często niewiele wiadomo o mechanizmach molekularnych, które odpowiadają za terapeutyczne efekty ich działania oraz za skutki uboczne (Korostyński et al., 2013; Crespo-Facorro, Prieto i Sainz, 2014; Piechota et al., 2015). Indukcja transkrypcji jest przejściowa i w większości przypadków trwa maksymalnie do kilku godzin. Jest to szczególnie dobrze widoczne w ekspresji tzw. genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (IEGs, z ang. *immediate-early genes*), których cechą wspólną jest szybka i krótkotrwała aktywacja w odpowiedzi na szeroką gamę bodźców (Grassi-Zucconi i Bentivoglio, 1998; Lanahan i Worley, 1998; Pérez-Cadahía et al., 2011). Geny te stanowią pierwszą linię odpowiedzi komórki, zanim nastąpi synteza produktów genów

specyficznych dla konkretnego bodźca. Różnią się one pod względem właściwości strukturalnych i mechanizmów regulacji, ale cała grupa uważana jest za „bramy do odpowiedzi genomowej”, a konkretnie do różnych programów ekspresji genów. Zmiany w poziomie ekspresji czynników transkrypcyjnych oraz różnice w ich profilach czasowych i przestrzennych, a także grupach genów, które aktywują składają się na złożony zestaw sygnałów kontroli transkrypcji, który służy do koordynacji ekspresji genów późnej odpowiedzi. Indukcja ekspresji IEGs jest często postrzegana jako globalna i ogólna reakcja, natomiast należy pamiętać, że każdy gen (lub grupa genów) może być odmiennie regulowana w różnych obszarach mózgu i pod wpływem różnego rodzaju stymulacji (Beckmann i Wilce, 1996; Pérez-Cadahía et al., 2011; Tyssowski et al., 2018). Geny *Egr1*, *Arc*, *Fos* to przykłady IEGs, których ekspresja w mózgu jest związana z pamięcią i uczeniem się (Guzowski, 2002; Barco, Bailey i Kandel, 2006). Ponieważ zaburzenia tych procesów to wspólny objaw w przebiegu wielu chorób psychicznych, wskazuje się, że badanie roli zmienionej regulacji IEG w modelach zwierzęcych zaburzeń psychicznych może rzucić światło na genetyczne i cząsteczkowe podłoże tych chorób (Gallo et al., 2018).

Badanie Greenberga (1986) i współpracowników jako pierwsze pokazało, że aktywacja receptorów na powierzchni komórek posiadających cechy neuronów indukuje ekspresję genów. Stymulowanie nikotyną receptorów cholinergicznym tych komórek doprowadziło do szybkiej aktywacji transkrypcji *Fos* i aktywności w warunkach *in vitro*. Obserwacja, że do aktywacji transkrypcji kluczowe jest otwarcie kanałów Ca^{2+} , a zatem depolaryzacja komórki, będąca koniecznym etapem generowania potencjałów czynnościowych sugerowała, że proces ten zachodzi także *in vivo*. Badanie to pozwoliło dostrzec związek między zewnętrzną stymulacją i zmianą aktywności bioelektrycznej, a następującymi w komórce procesami transkrypcji. Było to jedno z odkryć, które przyczyniły się do rozwoju nowego nurtu badań mającego na celu badanie zależnych od aktywności synaptycznej zmian w plastyczności zarówno na poziomie synaps jak i całych sieci neuronalnych. Zaowocowały one obserwacją, że aktywność komórek nerwowych reguluje ekspresję wielu genów ważnych dla przeżycia, różnicowania neuronów, synaptogenezy, a także właściwego rozwoju układu nerwowego oraz złożonych form zachowania. Nieprawidłowości w procesach regulowanej aktywnością neuroplastyczności są natomiast związane z występowaniem chorób układu nerwowego i zmian neurodegeneracyjnych (np. schizofrenia, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona), zaburzeń neurorozwojowych (np. zaburzenia ze spektrum autyzmu, zespół

Retta, zespół łamliwego chromosomu X) (Chaudhury et al., 2016; Lewis i González-Burgos, 2008; Rebelo et al., 2021; Schirinzi et al., 2016).

Sztandarowym przykładem czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję wielu genów jest rodzina białek CREB (cAMP response element-binding protein), która obejmuje białka CREB, CREM (CRE-modulatory protein), ATF1 (activation transcription factor 1). W układzie nerwowym CREB reguluje aktywność genów wczesnych *Fos*, *FosB*, *Arc* (Manning et al., 2017; Sheng i Greenberg, 1990) oraz m.in genów kodujących BDNF (brain-derived neurotrophic factor), nNOS (neuronal nitric oxide synthase), białko regulatorowe zegara okołodobowego Per1 i presenilinę związaną z dziedziczną postacią choroby Alzheimera o wczesnym początku (West, Griffith i Greenberg, 2002). W aktywności hipokampa, szczególnie dla procesu konsolidacji wspomnień transkrypcja CREB ma kluczowe znaczenie w bramkowaniu regulowanej aktywności ekspresji genów, co stanowi przykład plastyczności synaptycznej na poziomie sieci (Guzowski, 2002; Barco, Bailey i Kandel, 2006).

Wywołana działaniem leku ekspresja genów warunkuje neuroplastyczność oraz długotrwałe skutki behawioralne po zaprzestaniu przyjmowania substancji. Jest to podstawa osiągnięcia i utrzymywania się efektów farmakoterapii. Pośrednie mechanizmy działania leków są też warte uwagi w kontekście wyjaśniania występowania odroczonego skutków klinicznych oraz ubocznych. Zjawisko to jest szczególnie charakterystyczne dla antydepresantów, ale występuje też w przypadku innych grup leków (Hyman i Nestler, 1996). Indukowanie określonego wzoru ekspresji genów prawdopodobnie warunkuje zmiany związane z neuroplastycznością, a w konsekwencji skutki przyjmowania substancji (Adriani et al., 2006; McClung i Nestler, 2008). Analiza transkrypcji indukowanej środkami psychotropowymi jest obiecującym i przyszłościowym podejściem w badaniu molekularnych mechanizmów ich działania. Zwłaszcza w przypadku substancji o wielu biologicznych punktach uchwytu i działaniu plejotropowym porównywanie ich efektów jedynie na poziomie grup receptorów jest niewystarczające. Aby ustalić podłoże ich działania potrzebnym uzupełnieniem jest studiowanie zmian jakie powoduje przyjmowanie danego środka na poziomie ekspresji genów. Specyficzne wzorce w jaki różne substancje aktywują ekspresję genów to tzw. sygnatury transkrypcyjne, które stanowią próbę zobrazowania zmian poziomu ekspresji w skali wybranego genu, wielu genów lub całego genomu (Zygmunt et al., 2016).

Doniesienia z zakresu farmakogenetyki (Sumner et al., 2003) wskazują, że nawet profile ekspresji jednego wybranego genu, w tym przypadku *Fos* różnią się między

poszczególnymi lekami, najprawdopodobniej w zależności od różnych mechanizmów działania oraz molekularnych punktów uchwytu danej substancji. Tym niemniej, dla leków należących do jednej klasy substancji (np. antypsychotyki) można wskazać pewien charakterystyczny wzór ekspresji, który jest odmienny pomiędzy grupami. W wyniku tego wysunięto hipotezę, że profile ekspresji *Fos* znanych leków psychotropowych mogą stanowić odniesienie ułatwiające klasyfikację nowych środków psychoaktywnych i jedną z przesłanek przewidywania ich skuteczności terapeutycznej. Aby przetestować tę hipotezę badacze analizowali indukowany przez mitrazepinę profil ekspresji *Fos*, na podstawie, którego udało się poprawnie zaklasyfikować ją do grupy leków antydepresantów.

Oprócz tworzenia opisów sygnatur ekspresji pojedynczych genów wczesnych lub genów swoistych dla poszczególnych substancji, możliwe jest również porównywanie całych sygnatur transkryptomicznych. Ma to istotne znaczenie w dalszym poznawaniu profilów farmakologicznych leków. Badanie zmian ekspresji wybranych genów dostarcza tylko bardzo fragmentarycznych danych o działaniu leku na mózg lub cały organizm. Dotychczas zgromadzone informacje odnośnie tego, które geny są indukowane pod wpływem podania substancji stanowią cenne wskazówki do analizy wyników przyszłych eksperymentów. Natomiast występują znaczące problemy w integracji danych z różnych badań. Powodem są nie tylko różne warunki eksperymentalne i używane modele, ale co ważne te cząstkowe informacje pomijają oddziaływania między genami i odmienną ekspresję w różnych populacjach komórek. Prawie niemożliwym wydaje się na chwilę obecną zbudowanie pełnego profilu ekspresji, który odpowiada za zmiany metaboliczne i efekty behawioralne, z danych cząstkowych. Natomiast metody pozwalające zbadać jednoczesne zmiany transkrypcyjne w skali całego genomu pozwalają całościowo opisać indukowany wzór ekspresji. Transkryptomiczna sygnatura ekspresji genów stanowi dobry punkt wyjścia aby obserwować złożone oddziaływania między poszczególnymi genami i ich grupami. Pozwala to na formułowanie hipotez np. odnośnie tego jakie szlaki sygnalizacyjne są aktywowane i jakie znaczenie funkcjonalne ma indukcja konkretnej grupy genów. Dzięki temu, możliwe jest eksplorowanie na poziomie całego transkryptomu wzorców ekspresji, które mogą być związane z efektami terapeutycznymi, uzależniającymi czy nagradzającymi danej substancji. Sygnatury transkrypcyjne mogą też w przyszłości posłużyć do stworzenia klasyfikacji leków w oparciu o profilowanie ekspresji genów. (Gunther et al., 2003; Gunther i Gerwien, 2004; Dugger, Platt i Goldstein, 2018; Zygmunt et al., 2019).

W niniejszej pracy, przy użyciu transkryptomiki przestrzennej, badano profil transkrypcyjny w skali całego skrawka. Uzyskane dane stanowią pierwszy krok w stronę ustalania wielogenowej sygnatury ekspresji indukowanej podaniem rysperydonu. Jest to szeroko stosowany i badany wcześniej lek antypsychotyczny drugiej generacji (SGA, z ang. *second generation antipsychotics*) (Gunther et al., 2003; Korostyński et al., 2013; Sumner et al., 2003; Zygmunt et al., 2019). Rysperydon zalecany jest głównie w leczeniu schizofrenii, choroby afektywnej dwubiegunowej i drażliwości związanej z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (identyfikator PubChem: CID 5073). SGA to grupa leków o zróżnicowanym działaniu farmakologicznym i niejednakowej tendencji do wywoływania skutków ubocznych. Natomiast ich charakterystyczną cechą wspólną jest silne działanie antagonistyczne wobec receptorów serotoniny 5-HT_{2A} połączone z relatywnie słabszym antagonizmem wobec receptorów dopaminy D₂. Ten profil działania na receptory D₂ wiąże się z mniejszym spadkiem poziomu dopaminy w szlaku nigrostriatalnym i mniejszym ryzykiem wywołania potencjalnie trwałych pozapiramidowych skutków ubocznych (EPS, z ang. *extrapyramidal side effects*), jak np. polekowy parkinsonizm. Natomiast oddziaływanie na receptory 5-HT_{2A} powoduje odhamowanie wydzielania dopaminy, co prowadzi do zmniejszenia EPS poprzez szlak nigrostriatalny oraz zmniejsza lub eliminuje prawdopodobieństwo hiperprolaktynemii przez szlak guzkowo-lejkowy (Stahl, 2000). Rysperydon wiąże się z bardzo wysokim powinowactwem do receptorów 5-HT_{2A}, około 10-20-krotnie większym niż powinowactwo wiązania leku z receptorami D₂ (Fenton i Scott, 2005; Marder i Meibach, 1994). Niższy wskaźnik zajęcia receptorów D₂ zmniejsza ryzyko wystąpienia EPS (Mauri et al., 2014). Badania wskazują, że rysperydon silnie indukuje ekspresję, ale jego efekt jest zlokalizowany do poszczególnych struktur lub nawet ich części. Jest to dobrze widoczne np. w profilu ekspresji *Homer1* po podaniu rysperydonu (De Bartolomeis et al., 2017; Sumner et al., 2003).

Zatem transkryptomika przestrzenna wydaje się właściwą drogą kontynuacji badań nad miejscową specyficznością tego leku i niezbędnym uzupełnieniem dotychczas zgromadzonej wiedzy. Mamy nadzieję, że pozyskane dane w przyszłości będą mogły stanowić materiał referencyjny, do porównań zarówno transkryptomicznych sygnatur ekspresji, jak i profilów ekspresji poszczególnych genów, podczas testowania potencjalnych nowych leków. Podobieństwo ich wzorca ekspresji do sygnatury rysperydonu może stanowić cenną informację w procesie klasyfikowania nowych środków jako potencjalnie terapeutycznych i przewidywania potencjalnych skutków

ubocznych. Z kolei opisanie wielogenowych sygnatur i efektów biologicznych wielu leków z różnych klas mogłoby stanowić bazę do analiz w jaki sposób budowa cząsteczkowa substancji wiąże się z jej działaniem farmakologicznym. Podjęcie prób stworzenia tak ogromnych baz danych doświadczalnych jest możliwe dzięki pozyskiwaniu całościowych profilów ekspresji genów (lub też profilów biosyntezy białek). Dane transkryptomyczne pozwalają na opis całkowitego RNA w komórce, określanie położenia genów pod względem miejsc startowych 5' i końców 3', badanie alternatywnych wariantów transkrypcyjnych i modyfikacji posttranskrypcyjnych (Wang, Gerstein i Snyder, 2009). Pomimo trudności związanych z analizą tak dużych i wewnętrznie złożonych zbiorów danych, ta możliwość stanowi przełom w metodyce badań genetycznych oraz diagnostyce medycznej.

Pierwsze techniki stosowane do badania ekspresji genów, oparte na sekwencjonowaniu metodą Sanger'a były używane do sekwencjonowania losowych transkryptów i prób identyfikacji pojedynczych genów za pomocą charakterystycznych fragmentów sekwencji. Początkowo liczbę poszczególnych transkryptów oznaczono pojedynczo lub po kilka genów przy użyciu hybrydyzacji RNA (Northern blot). Stosowanie tej metody pozwoliło na wykrywanie wielkości cząsteczek RNA oraz alternatywnych wariantów transkrypcyjnych. A także kontrolę jakości i ilości RNA na żelu przy elektroforezie. Później zaczęto używać do tego celu również ilościowej reakcji PCR (qPCR). W porównaniu do hybrydyzacji RNA ma ona o wiele wyższą czułość, dzięki której ilościowe oznaczenie mRNA jest możliwe nawet jeśli materiałem badawczym jest pojedyncza komórka (Streit et al., 2009). Podobnie wysoka rozdzielczość charakteryzuje hybrydyzację *in situ*, która jako technika histologiczna pozwala zachować informacje przestrzenną. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja typów komórek, w których ulega ekspresji gen będący przedmiotem zainteresowania (Wilcox, 1993). Ograniczeniem w stosowaniu hybrydyzacji *in situ* jest niska czułość i ograniczona dostępność sond specyficznych dla sekwencji (Huber, Voith von Voithenberg i Kaigala, 2018). Proces badania ekspresji genów wymienionymi metodami był pracochłonny i dostarczał jedynie cząstkowych informacji o pewnych miejscach w genomie (Morozova, Hirst i Marra, 2009). Sytuację poprawiła seryjna analiza ekspresji genów (SAGE), gdzie transkrypty oznaczono ilościowo, dopasowując fragmenty do znanych genów (Velculescu et al., 1995). Natomiast prawdziwą rewolucję stanowiło dopiero opracowanie wysokoprzepustowych metod profilowania ekspresji technikami mikromacierzy DNA i sekwencjonowania RNA (RNAseq) (Schena et al., 1995; Wang,

Gerstein i Snyder, 2009). Zastosowanie mikromacierzy DNA było przełomowym krokiem, gdyż pozwoliło po raz pierwszy na genotypowanie wielu regionów genomu oraz śledzenie zmian poziomu ekspresji dużej liczby genów jednocześnie. Użycie tej metody wiąże się jednak z wieloma problemami technicznymi obniżającymi wydajność, które zostały rozwiązane wraz z opracowaniem metody sekwencjonowania RNA.

Sekwencjonowanie RNA (RNAseq) jest techniką wysokoprzepustową, która oprócz informacji odnośnie poziomu ekspresji dostarcza też danych o sekwencjach genów. W ciągu ostatniej dekady stało się ono niezbędnym narzędziem do badania ekspresji genów w skali całego transkryptomu, zmian transkrypcyjnych w czasie i analizy różnicowej ekspresji genów między grupami (Stark, Grzelak i Hadfield, 2019). Oprócz poliadenylowanych transkryptów mRNA ta metoda sekwencjonowania może być używana do badania całkowitego RNA, w tym różnych populacji RNA, pre-mRNA oraz niekodujących rodzajów RNA takich jak rRNA, tRNA, lncRNA, miRNA, piRNA. RNA-Seq to technika oparta na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS, z ang. *next-generation sequencing*). W porównaniu do wcześniejszych technik opartych na sekwencjonowaniu metodą Sanger, a później na hybrydyzacji zapewnia ono znacznie większe pokrycie i rozdzielczość pozwalającą uchwycić ciągle zmieniającą się naturę transkryptomu (Kukurba i Montgomery, 2015; Stark et al., 2019). Prawidłowe składanie sekwencji transkryptów jest możliwe zarówno przy użyciu genomu referencyjnego jak i *de novo*. (Martin i Wang, 2011). Ta cecha umożliwia wykrywanie nowych wariantów transkrypcyjnych tego samego genu, modyfikacji posttranskrypcyjnych, mutacji, polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) i innych zmian na poziomie całego genomu oraz badanie organizmów innych niż modelowe, ponieważ nie jest zależna od odniesienia do wyników poprzednich badań (Hong et al., 2016; Mantione et al., 2014). Sekwencje cDNA są mapowane na unikalne regiony w genomie, co prowadzi do redukcji sygnału tła. Wysoką czułość i wymierne wyniki RNAseq zapewnia brak górnej i dolnej granicy kwantyfikacji, które zależą od liczby zliczeń, a nie opierają się na względnym ustalaniu liczby transkryptów (Wang, Gerstein i Snyder, 2009).

Należy jednak pamiętać, że zbiorcze sekwencjonowanie RNA wyizolowanego z badanej tkanki ujawnia jedynie średni profil ekspresji genów bez rozróżniania na poszczególne typy komórek. Próbą rozwiązania tego problemu było przeprowadzanie RNAseq na laserowo pozyskiwanych mikroskawkach (LCM - Laser Capture Microdissection). W wyniku zastosowania tego zabiegu zaczęto opisywać specyficzne dla populacji profile ekspresji genów. Natomiast możliwe było badanie tylko małej ilości

komórek, a jakość pozyskiwanego RNA była niska. Szeroko stosowaną odmianą RNAseq, która rozwiązuje problem uśredniania profilu ekspresji między różnymi populacjami komórek w preparacie jest sekwencjonowanie pojedynczych komórek scRNAseq (single cell RNA sequencing). Ta technika pozwala w oparciu o dane z sekwencjonowania rozróżnić znane typy i podtypy komórek, a zatem opisać ich sygnaturę ekspresji oraz wykryć komórki odbiegające od opisanych wzorów ekspresji np. po transformacji nowotworowej. Natomiast zarówno masowe RNAseq (bulk RNAseq), LCM-RNAseq i scRNAseq łączy wspólny problem całkowitej utraty danych o położeniu komórki w tkance na etapie przygotowywania materiału do sekwencjonowania.

Tymczasem informacja o anatomicznej lokalizacji komórki w tkance ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia jej funkcji, oddziaływań międzykomórkowych oraz wykrycia patologicznych zmian na poziomie komórki i całej tkanki (Ståhl et al., 2016; Larsson, Frisén i Lundeberg, 2021). Celem uzyskania tych danych niedawno opracowano technologię cyfrowego profilowania przestrzennego (DSP, z ang. *digital spatial profiling*), którego wynikiem jest uzyskanie cyfrowego profilu abundancji RNA w wybranych regionach preparatu. Jednakże konieczność wielokrotnych zagnieżdżeń, stosunkowo niewielka liczba wybranych mRNA, które można badać jednocześnie, oraz wymóg wstępnej znajomości sekwencji genu istotnie ograniczają użyteczność tej metody (Wang et al., 2020). RNAseq, a szczególnie masowe RNAseq, jest przełomową techniką w badaniu ekspresji genów i przyczyniło się do gwałtownego rozwoju transkryptomiki. Jednakże, informacja o przestrzennych zmianach w dystrybucji mRNA pozostawała brakującym ogniwem aby możliwe było powiązanie czasowych i przestrzennych zmian w transkrypcji ze zmianami w neurotransmisji, neuroplastyczności, metabolizmie i zachowaniu.

Jednym z najnowszych zastosowań RNAseq jest użycie tej metodyki do rozwijania transkryptomiki przestrzennej, która jest przedmiotem metodologicznej części tej pracy (Stark, Grzelak i Hadfield, 2019). Technika ta pozwala uzyskać ilościowe dane dotyczące ekspresji genów i zwizualizować rozmieszczenie miejsc syntezy mRNA na przekrojach tkanek. Zastosowanie macierzy starterów do odwrotnej transkrypcji z unikalnymi pozycyjnymi kodami do umieszczania skrawków histologicznych pozwala uzyskać wysoką jakość danych z sekwencjonowania RNA z zachowaną dwuwymiarową informacją o miejscu zachodzenia transkrypcji. Takie podejście technologiczne posiada cały szereg zalet. Na początku pozwala pominąć etap izolacji komórek z tkanki, który naraża je na zniszczenie i prowadzi do wybiórczej analizy pewnej ich frakcji. Dzięki

przetwarzaniu całego preparatu w jednej reakcji techniczna zmienność warunków eksperymentalnych oraz różnice między pomiarami różnych grup próbek (efekt serii z ang. *batch effect*) są zredukowane do minimum. Stosowanie tej metody nie wymaga również wielokrotnych ani zagnieżdżonych znakowań na tym samym materiale, co rozwiązuje problem malejącej efektywności kolejnych znakowań. Na poziomie analizy badacz nie jest ograniczony do wstępnie wybranych regionów ani markerów molekularnych, dowolna kombinacja obecności lub braku ekspresji zestawu genów może posłużyć do ustalenia interesującego profilu ekspresji i dalszej analizy. Wreszcie wyniki ujawniają nieoczekiwaną heterogeniczność sąsiadujących obszarów w tkance, co nie jest możliwe do wykrycia za pomocą analizy transkryptomu po izolacji komórek z miejsca ich położenia. Taka niejednorodność w ekspresji genów między sąsiadującymi regionami w tkance jest nie tylko bardzo interesująca z perspektywy nauki, ale ma też kluczowe znaczenie dla zastosowań diagnostycznych, gdyż prawdopodobnie odzwierciedla odmienne podklony, z różną ekspresją genów związanych np. z inwazyjnością nowotworu (Marx, 2021; Ståhl et al., 2016).

Podsumowując, transkryptomika przestrzenna wymaga jedynie kilku dodatkowych kroków w porównaniu z analizą wyników RNAseq przeprowadzanego na homogenizowanych tkankach lub pojedynczych komórkach, przy jednoczesnym uzyskiwaniu informacji o przestrzennym zorganizowaniu profilu transkrypcyjnego (Ståhl et al., 2016). Niewątpliwie możliwości tej rozwiniętej w ostatnich latach technologii sprawiają, że jest ona fascynującym i wartym eksplorowania podejściem metodologicznym. Pierwsze zastosowania do badania szczegółów anatomicznego zróżnicowania tkanek okazały się sukcesem (Ortiz et al., 2020). Kolejne potencjalne zastosowania tej metody to badanie czasoprzestrzennych profili transkrypcyjnych np. w toku ontogenezy albo progresji choroby, oraz analiza różnicowa ekspresji genów po różnego rodzaju manipulacjach eksperymentalnych.

2. Cele

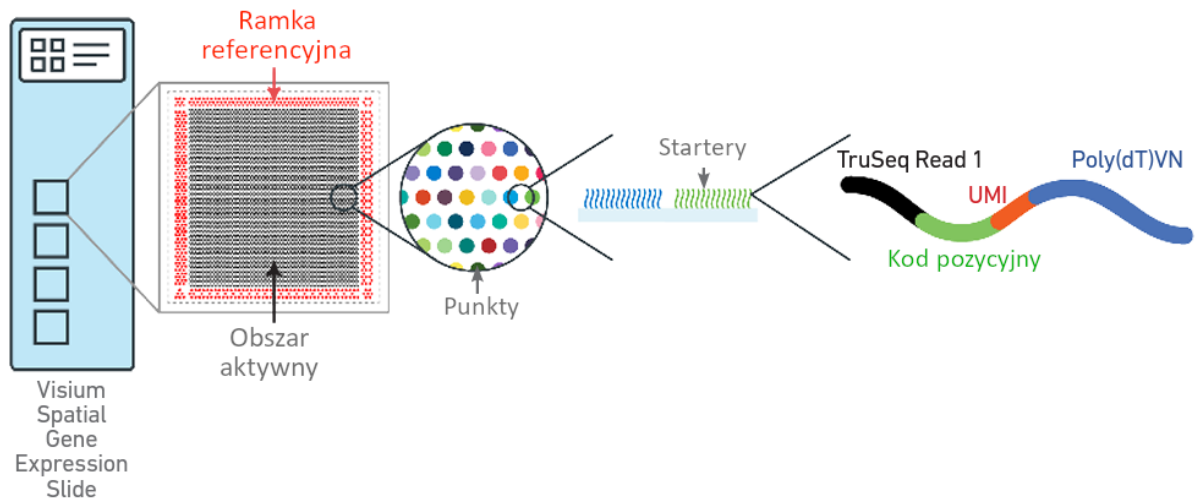
1. Opracowanie metodyki transkryptomiki przestrzennej i zweryfikowanie jej użyteczności do ustalania profilu działania leku *in situ*.
2. Identyfikacja przestrzennego wzorca działania rysperydonu w korze przedczołowej i prążkowie myszy.
3. Opracowanie metod analizy danych z transkryptomiki przestrzennej w celu identyfikacji procesów powiązanych z działaniem leku w różnych obszarach mózgu.

3. Materiały i metody

3.1 Zarys metody przestrzennej analizy transkrypcji

Wdrażanie metody przeprowadzono w dwóch etapach. Najpierw zoptymalizowano warunki syntezy na materiale kontrolnym, a w następnej kolejności przystąpiono właściwego eksperymentu, z którego przygotowano biblioteki cDNA. Do optymalizacji warunków syntezy cDNA w tkance zastosowano szkiełko - Visium Spatial Tissue Optimization slide, (10x Genomics, 1000193). Ma ono osiem obszarów aktywnych otoczonych wytrawionymi ramkami - 8x8 mm. Każdy z tych obszarów jest powierzchnią pokrytą cząsteczkami oligonukleotydów do wychwytywania mRNA. Każda sonda ma startery poli(dT) umożliwiające syntezę cDNA. Sygnał fluorescencji jest używany jako pośrednia informacja o efektywności procesu permeabilizacji. Obrazowanie fluorescencji nie jest wymagane dla głównej reakcji konstrukcji bibliotek, jest używane tylko na etapie optymalizacji. Za pomocą sygnału fluorescencji pochodzącego z wyznakowanych fluoroforem deoksyrybonukleotydów cDNA można porównać efektywność różnych czasów permeabilizacji tkanki.

W drugim etapie do analizy transkryptomu zastosowano szkiełko Visium Spatial Gene Expression Slide, (10x Genomics, 1000187). Na jego powierzchni cztery aktywne obszary również otoczone są wytrawionymi ramkami odniesienia. Wymiar obszaru aktywnego to 6,5x6,5 mm, mierzony razem z ramką referencyjną 8x8 mm. Pojedynczy obszar aktywny składa się z około 5000 punktów o średnicy 55 μm . Każdy z punktów (tzw. spotów) zawiera miliony przyłączonych do szkła krótkich sekwencji oligonukleotydowych, które hybrydują do cząsteczek mRNA obecnych w tkance. Budowa obszaru aktywnego na szkiełku i tworzących go starterów oligonukleotydowych została zobrazowana poniżej na Rycinie 1.



Rycina 1 Schemat budowy obszarów aktywnych na szkiełku do tworzenia bibliotek w technologii Visium. Zmodyfikowano na podstawie protokołu producenta (10x Genomics) - CG000239 Visium Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide RevD. Startery oligonukleotydy na powierzchni szkiełka są zbudowane liniowo w następujący sposób:

- i. (Illumina) TruSeq Read 1 - częściowy odczyt 1 startera do sekwencjonowania;
- ii. Kod pozycyjny - wszystkie startery w danym punkcie mają taki sam kod pozycyjny;
- iii. UMI – Unikalny Identyfikator Molekularny;
- iv. Poli(dT)VN - sekwencja do wychwytywania poliadenylowanego mRNA do syntezy cDNA .

3.2 Zwierzęta

W eksperymentach użyte zostały dorosłe (w wieku ok. 9 tygodni) samce myszy C57BL/6 (*Mus musculus* L.) pochodzące z hodowli prowadzonej przez Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Zwierzęta przebywały w grupach po 4 myszy w jednej klatce bytowej, w pomieszczeniu o stałej temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ oraz cyklu dobowym światło-ciemność po 12h. Zwierzęta miały dostęp do pokarmu oraz wody *ad libitum*. Wszystkie eksperymenty były wykonywane zgodnie z wytycznymi Parlamentu Europejskiego i Rady Europejskiej dotyczącymi opieki i wykorzystania zwierząt laboratoryjnych (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. O ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych). Protokoły eksperymentalne zostały sprawdzone i zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (nr zgody 34/2021).

3.3 Podania leku

W grupie badawczej zastosowano jednokrotne podania rysperydonu (dootrzewnowo, 0,5 mg/kg w objętości 5 μl /g masy ciała; Biotrend AG, BG0309), a w grupie kontrolnej podawano analogiczną objętość fizjologicznego roztworu soli (Polpharma). Rysperydon rozpuszczono w 20 μl ~38% HCl (POCH S.A; BA5283115) i rozcieńczono w roztworze soli fizjologicznej. Wszystkie iniekcje były wykonywane w fazie jasnej cyklu dobowego. Habitacja zwierząt do eksperymentatorów przed właściwą iniekcją trwała 5 dni, w trakcie których wykonano dwie iniekcje roztworu soli fizjologicznej w następujących po sobie dniach, by przyzwycząić myszy do tej procedury. Zwierzęta były uśmiercane przez dyslokację kręgów szyjnych 2h po ostatnim podaniu - leku w grupie eksperymentalnej lub roztworu soli fizjologicznej w grupie kontrolnej. Dawka leku i czas po jakim badany był jego wpływ na ekspresję genów zostały ustalone w oparciu o narzędzie genes2mind (www.genes2mind.org) opracowane do eksploracyjnej analizy ekspresji genów w mózgu wywołanej lekami psychotropowymi oraz poprzednie badania zespołu (Korostyński et al., 2013; Zygmunt et al., 2018).

3.4 Preparacja tkanki

Mózgi preparowano według zaleceń z protokołu 10x Genomics. Po wyjęciu z czaszki, przemywano je krótko roztworem soli fizjologicznej, odsączano nadmiar cieczy i umieszczano w foremkach do zatapiania tkanek (Peel-A-Way Embedding Mold (Square - S22,) Polysciences, 18646A-1). Dno foremek uprzednio pokrywano warstwą nośnika do zatapiania tkanek OCT (OCT Embedding matrix, CellPath, KMA-0100-00A). Po umieszczeniu mózgu na warstwie medium, zatapiano go w całości w OCT. Następnie przy pomocy pęsety foremka z mózgiem w OCT była zanurzana na ok. minutę w łaźni chłodzącej - złożonej z metalowej zlewki wypełnionej do dwóch trzecich wysokości izopentanem i umieszczonej w naczyniu Dewara wypełnionym ciekłym azotem. Po zamrożeniu (obserwowano jak po około minucie OCT robił się mlecznobiały i nieprzejrzysty) bloczek umieszczano w plastikowej probówce wykorzystywanej do przechowywania preparatów w -80°C . Następnego dnia, przed rozpoczęciem krojenia zarówno preparaty jak i czyste szkiełka umieszczano w komorze kriostatu (Leica CM3050 S), na co najmniej 30 minut w celu wyrównania temperatury do -20°C . Mózgi skrawano w płaszczyźnie czołowej na plastry o grubości $10\ \mu\text{m}$, przy ustawieniach temperatury komory kriostatu na -20°C oraz uchwytu z preparatem na -10°C . Badane struktury – korę przedczołową i prążkowie skrawano z obszarów około 1,94 - 1,34 mm od bregmy, wykorzystując jako odniesienie atlas Paxinosa i Franklina (2001). Do reakcji tworzenia bibliotek pobrano 4 skrawki na szkiełko Visium Spatial Gene Expression Slide (2 z grupy kontrolnej i 2 od zwierząt traktowanych rysperydonem). Aby ocenić degradację RNA od wszystkich 8 zwierząt pobrano po 10 skrawków o grubości $25\ \mu\text{m}$. Do barwień immunohistochemicznych wykorzystano skrawki o grubości $10\ \mu\text{m}$.

3.5 Izolacja i ocena jakości RNA

Izolację RNA wykonano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen). W pierwszym etapie dokonano homogenizacji tkanki. W tym celu próbki rozmrożono i na lodzie dodano do nich po $350\ \mu\text{l}$ buforu RLT oraz po 1 stalowej kulce na próbkę, która posłużyła do mechanicznego rozdrobnienia tkanki w aparacie TissueLyser II (Qiagen). Próbki umieszczono w kasetach statywu do Tissue Lysera II, gdzie zostały one poddane homogenizacji przez 3 minuty z maksymalną częstotliwością wychylenia $24\ \text{Hz}$. Następnie obrócono kasety statywu o 180° w poziomie i powtórzono proces przez kolejne 3 minuty, $24\ \text{Hz}$. Zhomogenizowane próbki zwirowano przez 3 minuty z maksymalną prędkością w 4°C . Przeniesiono $300\ \mu\text{l}$ nadsącza do nowych probówek, które

umieszczono następnie w urządzeniu QIAcube (Qiagen) do automatycznej izolacji RNA. Izolację przeprowadzono według instrukcji producenta, stosując standardowy protokół „Animal tissues and cells” (objętość elucji: 30 µl w wodzie wolnej od nukleaz (Ambion)). Po skończonej izolacji próbki wytrząsnięto, krótko zwirowano i umieszczono w -20°C.

Stopień degradacji RNA, po izolacji z bloczków zamrożonych w OCT, sprawdzono przy użyciu metody elektroforezy kapilarnej wykorzystując bioanalyzer Agilent 2100. Czip z zestawu Agilent RNA 6000 Nano przygotowano według protokołu producenta i umieszczono w urządzeniu. Uzyskane wartości RIN (z ang. *RNA Integrity Number*) dla materiału od wszystkich 8 zwierząt wyniosły 8,7 – 10.

3.6 Utrwalanie w metanolu i barwienie hematoksyliną i eozyną

Szkiełka (zarówno szkiełko do optymalizacji jak i dedykowane do właściwej reakcji) przenoszono z -80°C na suchym lodzie, a następnie umieszczano na rozgrzanym wcześniej metalowym adapterze (10x Genomics; 1000194) w termocyklerze PTC-200 (MJ Research) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 minutę z otwartą pokrywą termocyklera. Następnie szkiełko, inkubowano w temperaturze -20°C przez 30 min. Do kolejnych kroków przygotowano 50 ml wody dejonizowanej w probówce wirówkowej, po 800 ml wody dejonizowanej w trzech szklanych zlewkach laboratoryjnych (1, 2 i 3) oraz roztwór eozyny w proporcji eozyna Y (Merck) 1:9 bufor Tris-octan (0,45 M, pH 6,0, Merck). Kolejne kroki wykonywano w temperaturze pokojowej jeśli nie zaznaczono inaczej. Po wyjęciu szkiełka z metanolu skrawki pokrywano 500 µl izopropanolu i inkubowano przez minutę, po czym odczynnik zlewano i suszono szkiełko na powietrzu przez 2-3 minuty. Następnie pokrywano szkiełko 1 ml roztworu hematoksyliny (Merck, 51275-100ML) i inkubowano przez 7 min. Po zlanii barwnika zanurzano szkiełko 5× w przygotowanej wodzie dejonizowanej w probówce wirówkowej (50 ml), a następnie 15× w wodzie w zlewce 1 oraz 15× w zlewce 2. Dodano 1 ml buforu Bluing Buffer, równomiernie pokrywając wszystkie skrawki i inkubowano 2 min, następnie reagent zlano z powierzchni szkiełka. Zanurzono szkiełko 5× w wodzie dejonizowanej w zlewce 2. Następnie dodano 1 ml przygotowanej mieszaniny eozyny Y z buforem i inkubowano przez 1 min, po czym odczynnik zlano. Zanurzono szkiełko 15× w wodzie dejonizowanej w zlewce 3. Wysuszono szkiełko na powietrzu, aż tkanka stała się nieprzezroczysta. Następnie inkubowano szkiełko na adapterze termocyklera przy otwartej pokrywie przez 5 minut w temperaturze 37°C.

3.7 Obrazowanie

Obrazowanie preparatów zostało przeprowadzone w Środowiskowym Laboratorium Obrazowania *in vivo* i *in vitro* Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie na mikroskopie konfokalnym Leica TCS SP8 WLL. Zastosowano obiektywy o powiększeniach 5-, 10- lub 20- krotnym (HC PL FLUOTAR 5x NA: 0,15 (DRY), HC PL FLUOTAR 10x NA: 0.30 (DRY), HC PL APO CS2 20x NA: 0.75 (DRY). Zgodnie z wytycznymi 10x Genomics, w oprogramowaniu LASX utworzono makra do obrazowania dla obu protokołów Visium - optymalizacji i właściwej reakcji konstrukcji bibliotek. Zarówno w jasnym polu i fluorescencji, obrazowano wszystkie obszary aktywne naraz i przy tym ustawieniu oraz powiększeniu 5x wykonywano fotografie całego szkiełka. Umożliwiały one porównanie skrawków między sobą, co było szczególnie ważne dla procesu optymalizacji. W toku pracy nad właściwą reakcją konstrukcji bibliotek wykonano również fotografie pojedynczych skrawków potrzebne do analizy danych.

Obrazowania wyników barwienia hematoksyliną i eozyną przeprowadzono w polu jasnym przy użyciu mikroskopu z kamerą DFC 7000 T (Leica Microsystems) wykorzystując następujące ustawienia: obraz w kolorze, kodowanie 8 bit, rozdzielczość 1,54 μm , czas ekspozycji: 100 ms – 2 s

Obrazowanie fluorescencyjne w polu ciemnym, wykonywane w toku optymalizacji przeprowadzono przy użyciu mikroskopu z kamerą DFC 7000 T (Leica Microsystems) i lampy fluorescencyjnej EL6000 (Leica Microsystems) wykorzystując następujące ustawienia: obraz monochromatyczny, kodowanie 12 bit, rozdzielczość: 1,54 μm .

Scalenie oraz obróbkę zdjęć wykonano w programach LASX i Fiji (ImageJ2). Uzyskane obrazy indywidualnych skrawków wyeksportowano w formacie .tiff i na ich podstawie wykonano analizę pokrycia obszarów szkiełka przez skrawki w programie Loupe Browser v5.0. Pliki wynikowe tej analizy (w formacie .json) posłużyły następnie do manualnego przyporządkowania odczytów RNA-seq do właściwych punktów rozmieszczonych na obszarach aktywnych, a zatem do odpowiednich części tkanki.

3.8 Permeabilizacja

Enzym permeabilizujący zawieszono i ogrzano do 37°C przez 15 min bezpośrednio przed użyciem. Adapter do termocyklera umieszczono wewnątrz urządzenia. Wybrano przygotowany wcześniej program do inkubacji w 37°C i uruchomiono go ze stałą temperaturą i podgrzewaniem pokrywy, aby adapter został równomiernie ogrzany zanim szkiełko zostanie na nim umieszczone. Szkiełko umieszczono w przeznaczonej do tego celu kasetce (Slide Cassette, Visium Accessory Kit, 10x Genomics; 3000406), co umożliwiło utworzenie osobnych dołków, tak by obszary aktywne szkiełek mogły być procesowane oddzielnie. Do tak utworzonych dołków dodawano po 70 µl enzymu permeabilizującego. Po dodaniu enzymu kasetkę zaklejono przy użyciu naklejki dołączonej do zestawu producenta (10x Genomics, 3000279) i położono na adapterze umieszczonym wewnątrz termocyklera w 37°C. Zamknięto pokrywę termocyklera i inkubowano w 37°C z podgrzewaniem pokrywy, przez czas dobrany na drodze optymalizacji tj. 16 min. Następnie po permeabilizacji zdjęto kasetkę ze szkiełkiem z adaptera termocyklera i umieszczono na blacie laboratoryjnym. Pipetą usunięto enzym do permeabilizacji z dołków kasetki i dodano po 100 µl 0,1× SSC (Merck).

3.9 Odwrotna transkrypcja

Adapter do termocyklera umieszczono wewnątrz urządzenia. Wybrano utworzony wcześniej program do inkubacji w 53°C. Na lodzie przygotowano mieszaninę do odwrotnej transkrypcji RT Master Mix (10x Genomics, 1000193, 1000187), na którą składały się: RT Reagent, Template Switch Oligo, Reducing Agent B, RT Enzyme D (odwrotna transkryptaza) rozpuszczone w wodzie wolnej od nukleaz (Ambion). Po dodaniu wszystkich odczynników wymieszano przez przepipetowanie 10× i krótko zwirowano. Następnie usunięto 0,1× SSC z dołków i dodano po 75 µl przygotowanego RT Master Mixu do każdego dołka. Kasetkę ze szkiełkiem ponownie zamknięto naklejką i umieszczono na rozgrzanym do temperatury 53°C adapterze do termocyklera. Zamknięto pokrywę termocyklera i w kolejnym kroku prowadzono odwrotną transkrypcję przez 45 min w 53°C.

3.10 Synteza drugiej nici cDNA i denaturacja

Po odwrotnej transkrypcji usunięto Master Mix ze wszystkich dołków. Następnie dodano po 75 μ l 0,08 M roztworu KOH (Merck) do każdego dołka i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie KOH został pipetą usunięty z dołków. Dodano 100 μ l buforu EB (Qiagen) do dołków, a następnie go usunięto. Przygotowano na lodzie mieszaninę do syntezy drugiej nici - Second Strand Mix (10x Genomics, 1000193, 1000187) złożoną z polimerazy DNA, starterów, odczynnika Second Strand Reagent, którą po dodaniu odczynników wytrząsnęto i zwirowano przed dodaniem do dołków w kasetce w objętości 75 μ l. Kasetkę ze szkiełkiem zamknięto nową naklejką i umieszczono na adapterze, w rozgrzanym do temperatury 65°C termocyklerze z podgrzewaniem pokrywy. Następnie prowadzono syntezę drugiej nici przez 15 min w 65°C. Kolejny krok stanowiła denaturacja i transfer cDNA z 4 obszarów aktywnych szkiełka do próbek celem amplifikacji i konstrukcji biblioteki. Po syntezie drugiej nici wyjęto kasetkę z termocyklera, usunięto naklejkę oraz odczynniki z dołków. Ponownie dodano po 100 μ l buforu EB do dołków, a następnie go usunięto, po czym dodano po 35 μ l 0,08 M KOH do każdego dołka i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Kolejno dodano po 5 μ l Tris 1 M, pH 6,95 (23,6°C) (Sigma Aldrich) do 4 próbek do PCR. Przeniesiono po 35 μ l próbki z każdego dołka do odpowiadającej próbki zawierającej bufor Tris. Probówki wytrząsnęto, krótko zwirowano i umieszczono na lodzie.

3.11 Amplifikacja i oczyszczanie cDNA przy użyciu SPRIselect

Przed przeprowadzeniem amplifikacji cDNA dobrano właściwą liczbę cykli reakcji qPCR zgodnie ze sposobem opisanym w protokole producenta. Przygotowano na lodzie mieszaninę do reakcji qPCR dodając w kolejności: wodę wolną od nukleaz (Ambion), KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, KK4600) i startery cDNA, a następnie wytrząsnęto i krótko zwirowano. Nałożono po 9 μ l mieszaniny qPCR do dołków na płytce 96-dołkowej do PCR. Przeniesiono po 1 μ l próbek do dołków w płytce z nałożoną mieszaniną qPCR. Celem uzyskania kontroli negatywnej dodano 1 μ l wody wolnej od nukleaz (Ambion) do dołka zawierającego mieszaninę do qPCR. Zawartość dołków wymieszano pipetą, płytkę krótko zwirowano i po umieszczeniu w termocyklerze CFX96 Real-Time (Bio-Rad) uruchomiono następujący program:

Tabela 1 Program termocyklera do oceny ilości uzyskanego cDNA.

Etap	Temperatura	Czas [minuty]
1	98°C	03:00
2*	98°C	00:05
3	63°C	00:30
4 → powrót do etapu 2, łącznie 25 cykli		

Następnie, również na lodzie, przygotowano mieszaninę do amplifikacji cDNA (Amp Mix i startery cDNA), która przed dodaniem została wytrząśnięta i zwirowana. Kolejno dodawano po 65 μ l tej mieszaniny do objętości ok. 35 μ l próbek pozostałych po denaturacji. Pipetą nastawioną na 90 μ l wymieszano 15 \times i krótko zwirowano próbki. Następnie umieszczono je w termocyklerze i uruchomiono następujący protokół amplifikacji cDNA z temperaturą pokrywy termocyklera ustawioną na 98°C:

Tabela 2 Program termocyklera do amplifikacji cDNA.

Etap	Temperatura	Czas [min]
1	98°C	03:00
2	98°C	00:15
3	63°C	00:20
4	72°C	01:00
Do etapu 2, Cq = 15 jako łączna liczba cykli		
6	72°C	01:00
7	4°C	∞

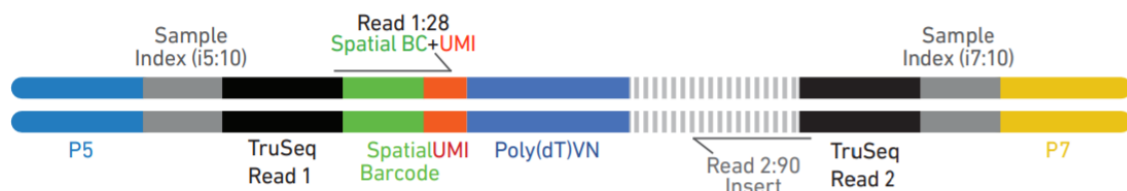
Po zakończonej amplifikacji otrzymane cDNA oczyszczano przy pomocy odczynnika SPRIselect. Przed użyciem SPRIselect (Beckman Coulter, B23318) wytrząśnięto \sim 30 s, tak aby kulki paramagnetyczne były równomiernie zawieszony w całej objętości zawiesiny. Tak przygotowany odczynnik dodano w objętości 60 μ l do każdej próbki (100 μ l) i wymieszano 15 \times . Po dodaniu próbki inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Próbki umieszczono wewnątrz dedykowanego do tego celu separatora magnetycznego (10x Genomics, 230003) w ułożeniu wysokim magnesu i odczekano, aż osad kulek paramagnetycznych z cDNA zgromadzi się na magnesie, a roztwór stanie się przejrzysty. Usunięto nadsącz i dodano po 200 μ l 80% roztworu etanolu do osadu na 30 s, po czym etanol również usunięto. Powtórzono ten krok tak, aby próbki zostały przepłukane etanolem dwukrotnie. Następnie próbki krótko zwirowano i umieszczono w separatorze magnetycznym w ułożeniu niskim magnesu. Usunięto

resztki pozostałego etanolu i wysuszono próbki na powietrzu przez ~2 minuty. Wyjęto je z magnesu i dodano po 40,5 µl buforu EB, po czym wymieszano 15× pipetą. Inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Ponownie umieszczono w separatorze magnetycznym w ułożeniu niskim magnesu i odczekano aż roztwór stanie się przejrzysty. Przeniesiono po 40 µl próbki do nowych probówek.

W następnym kroku sprawdzono jakość cDNA w bionalizatorze Agilent 2100 przy użyciu 1 µl każdej próbki, na czipie Agilent Bioanalyzer High Sensitivity. Do analizy wybrano region elektroforogramu ~200 - ~9000 pz. Odczytane stężenie w pg/µl pomnożono przez objętość elucji tj. 40 µl po amplifikacji cDNA i oczyszczaniu przy pomocy SPRIselect i podzielono przez 1000 aby uzyskać całkowitą ilość cDNA w ng. Pozostałe 39 µl próbek umieszczono w 4°C.

3.12 Konstrukcja bibliotek z kodami pozycyjnymi

Metoda Visium Spatial Gene Expression prowadzi do utworzenia bibliotek z kodami pozycyjnymi gotowych do sekwencjonowania w systemach Illuminy, w tym wypadku NovaSeq 6000. Do indeksowania bibliotek użyto zestawu Dual Index Kit TT Set A (10x Genomics, 1000215), który pozwala na podwójne oznakowanie konstruktyw kombinacją indeksów i5/i7 (każdy długości 10 nukleotydów) oraz oflankowanie starterami P5 i P7 na końcach konstruktu, które są używane w amplifikacji w systemach Illumina. TruSeq Read 1 i TruSeq Read 2 to standardowe miejsca starterów do sekwencjonowania Illumina stosowane w sekwencjonowaniu metodą sparowanych końców (z ang. *paired-end sequencing*). Pozycyjny kod - 16 pz i UMI (unikalny molekularny identyfikator) - 12 pz są kodowane w odczycie 1 (ang. *Read 1*), podczas gdy drugi odczyt (ang. *Read 2*) jest używany do sekwencjonowania fragmentu cDNA.



Rycina 2 Schemat budowy biblioteki Visium Spatial Gene Expression gotowej do sekwencjonowania. Zmodyfikowano na podstawie protokołu producenta (10x Genomics) - CG000239 Visium Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide RevD.

Biblioteki syntezowano przy użyciu stałej proporcji (10 μ l, 25%) całkowitego cDNA (40 μ l) otrzymanego po oczyszczeniu odczynnikiem SPRIselect (punkt 3.11). Kolejne kroki stanowiły fragmentacja oraz uzupełnienie końców i dołączenie ogonów poliA. Następnie selekcja rozmiaru cząsteczek przy użyciu odczynnika SPRIselect. Przed przygotowaniem mieszaniny do fragmentacji schłodzono termocykler do 4°C. Na lodzie przygotowano mieszaninę fragmentacyjną (bufor i enzym do fragmentacji). Następnie, w dalszym ciągu na lodzie, odmierzone po 10 μ l cDNA otrzymanego po oczyszczeniu SPRIselect z każdej próbki i przeniesiono do nowych probówek. Dodano po 25 μ l buforu EB do próbek. Kolejno, dodano po 15 μ l mieszaniny do fragmentacji. Zawartość probówek wymieszano 15 \times pipetą ustawioną na 35 μ l i krótko zwirowano. Próbki przeniesiono do schłodzonego uprzednio termocyklera i uruchomiono następujący program z podgrzewaniem pokrywy:

Tabela 3 Program termocyklera do reakcji fragmentacji i modyfikacji cDNA.

Etap	Temperatura	Czas [minuty]
Fragmentacja	32°C	05:00
Naprawa końców i dodawania ogonów poliA	65°C	00:30
-	4°C	∞

Odczynnik SPRIselect wytrząsnięto \sim 30 s i dodano w objętości 30 μ l do każdej próbki. Po dodaniu zawartość probówek wymieszano 15 \times pipetą. Próbki inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie przeniesiono je do separatora magnetycznego w ułożeniu wysokim magnesu i odczekano, aż roztwór stanie się przejrzysty. Przeniesiono po 75 μ l nadsącza do nowych probówek. Ponownie wytrząsnięto odczynnik SPRIselect. Dodano po 10 μ l SPRIselect do każdej próbki i wymieszano 15 \times pipetą. Inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Znow umieszczono próbki wewnątrz separatora magnetycznego w ułożeniu wysokim magnesu i odczekano, aż roztwór stanie się przejrzysty. Usunięto po 80 μ l nadsącza i dodano 125 μ l 80% roztworu etanolu (objętość/objętość) do osadu na 30 s, po czym etanol usunięto. Powtórzono ten krok, aby osad został przepłukany etanolem dwukrotnie. Krótko zwirowano próbki i umieszczono w separatorze magnetycznym w ułożeniu niskim magnesu. Usunięto resztki etanolu uważając by nie przesuszyć osadu. Próbki wyjęto z magnesu i dodano 50,5 μ l buforu EB, po czym wymieszano 15 \times pipetą.

Inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie umieszczono w separatorze magnetycznym w ułożeniu wysokim magnesu i odczekano, aż roztwór stanie się przejrzysty. Przeniesiono po 50 µl próbek do nowych probówek.

Kolejny etap stanowiła ligacja adapterów do sekwencjonowania i oczyszczanie konstruktów po ligacji przy użyciu odczynnika SPRIselect. W tym celu przygotowano 220 µl mieszaniny do ligacji fragmentów adapterowych (Adapter Ligation Mix, która składa się z buforu do ligacji – 88 µl, ligazy DNA - 44 µl, oligonukleotydów adapterowych - 88 µl), wymieszano pipetą i krótko zwirowano. Dodano po 50 µl mieszaniny do 50 µl każdej próbki, wymieszano 15× pipetą nastawioną na 90 µl i krótko zwirowano. Następnie inkubowano przez 15 minut w termocyklerze z temperaturą bloku 20°C i podgrzewaniem pokrywy. Po zakończonej ligacji oczyszczanie z SPRIselect przeprowadzono podobnie jak w punkcie 3.11, z następującymi różnicami: początkowo odmierzone 80 µl SPRIselect do każdej próbki, a po dwukrotnym przepłukaniu etanolem dodano 30,5 µl buforu EB, końcowo przeniesiono po 30 µl próbek do nowych probówek.

Następnie dobrano dla każdej z próbek znaczniki z zestawu Dual Index Kit TT Set A (10x Genomics, 1000215), których identyfikatory i sekwencje przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4 Identyfikatory i sekwencje indeksów i5/i7.

Nazwa próbki	i7_Indeks_ID	indeks i7 sekwencja	i5_Indeks_ID	indeks i5 sekwencja
A (R1)	SI-TT-A1_i7	GTAACATGCG	SI-TT-A1_i5	AGTGTTACCT
B (R2)	SI-TT-B1_i7	ACAGTAACTA	SI-TT-B1_i5	ACAGTTCGTT
C (K1)	SI-TT-C1_i7	TGCGCGGTTT	SI-TT-C1_i5	CAAGGATAAA
D (K2)	SI-TT-D1_i7	TGCAATGTTC	SI-TT-D1_i5	GCTTGTCGAA

Indeksowanie próbek przeprowadzono w reakcji PCR. Dodano po 50 µl Amp Mix (10x Genomics, 2000103) do 30 µl próbki w dołkach. Następnie po 20 µl mieszaniny unikalnych indeksów z zestawu A Dual Index TT Set A i wymieszano 5× pipetą ustawioną na 90 µl, a potem krótko zwirowano. Całkowitą liczbę cykli do reakcji indeksowania i amplifikacji ustalono na podstawie obliczenia stałej proporcji (10 µl, 25%) całkowitego cDNA (40 µl) otrzymanego po oczyszczeniu odczynnikiem SPRIselect (punkt 3.11). Dla 4 bibliotek średnia masa wyjściowego cDNA do reakcji indeksowania wynosiła 121,5 ng, co odpowiadało rekomendowanej liczbie cykli ~15.

Próbki przeniesiono do termocyklera i uruchomiono następujący program, z temperaturą pokrywą termocyklera nastawioną na 105°C:

Tabela 5 Program termocyklera do indeksowania i amplifikacji liniowej próbek w reakcji PCR.

Etap	Temperatura	Czas [min]
1	98° C	00:45
2	98 °C	00:20
3	67° C	00:30
4	72° C	00:20
Do etapu 2, Cq = 15 jako łączna liczba cykli		
6	72° C	01:00
7	4° C	∞

Przeprowadzono oczyszczenie fragmentów cDNA o wybranej długości za pomocą SPRIselect podobnie jak za pierwszym razem (selekcja rozmiaru cząsteczek po fragmentacji opisana wyżej w niniejszym punkcie) z następującymi różnicami: początkowo dodano 60 µl SPRIselect do każdej próbki, a po oczyszczeniu przeniesiono 150 µl nadsącza do nowych próbek. Po pierwszym wytrząśnięciu, ponownie dodano SPRIselect, ale w objętości 20 µl do każdej próbki. Po oczyszczeniu usunięto 165 µl nadsącza. Dwukrotne płukanie etanolem wykonano używając 200 µl 80% EtOH. Później dodano 35,5 µl buforu EB i po inkubacji przez 2 minuty umieszczono w separatorze magnetycznym ale w ułożeniu niskim magnesu. Gdy roztwór stał się przejrzysty, przeniesiono po 35 µl próbek do nowych próbek. Przygotowane próbki przechowywano w -20°C.

Przed wysłaniem bibliotek do sekwencjonowania przeprowadzona została kontrola jakościowa i ilościowa. Do 2 µl próbki dodano wodę dejonizowaną, aby osiągnąć rozcieńczenie 1:100. Sprawdzone jakość zsyntezowanych bibliotek cDNA w bioanlizatorze Agilent 2100 na czipie Agilent Bioanalyzer High Sensitivity przy użyciu 1 µl tak rozcieńczonych próbek. Do kontroli ilościowej przygotowano odczynniki z zestawu KAPA Library Quantification Kit dla platform Illuminy (KAPA Biosystems, KK4824). Użyto rozcieńczeń 1:10 000, 1:100 000 i 1:1 000 000 w trzykrotnych powtórzeniach. Przygotowano Master Mix i wodę dejonizowaną do oznaczania ilościowego rozcieńczeń DNA i roztworów wzorcowych DNA (standardów), przy zastosowaniu następujących ilości dla 1 objętości reakcji: SYBR Fast Master Mix + starter - 12 µl oraz woda dejonizowana - 4 µl. Nałożono po 16 µl Master Mixu na dołek

do oznaczeń ilościowych rozcieńczeń próbek i roztworów wzorcowych DNA na płytce 96-dołkową do PCR. Dodano po 4 μ l rozcieńczeń próbki i 4 μ l wzorców DNA do odpowiednich dołków płytki i zwirowano ją krótko. Umieszczono płytkę w urządzeniu CFX96 Real-Time system (Bio-Rad) i uruchomiono następujący program zgodnie z zaleceniami w protokole dołączonym do zestawu KAPA Library Quantification Kit:

Tabela 6 Program termocyklera do kwantyfikacji bibliotek

Etap	Temperatura	Czas [minuty]
1	95°C	05:00
2*	95°C	00:30
3	60°C	00:45
4 → powrót do etapu 2, 34x, łącznie 35 cykli		
Analiza krzywej topnienia	65-95°C	

Dla każdego z trzykrotnych powtórzeń próbek oraz roztworów wzorcowych obliczono średnią wartość C_q. Odrzucono wcześniej wyniki pomiarów, dla których wartość C_q różniła się o więcej niż 0,2 od pozostałych, według zaleceń KAPA Biosystems.

3.13 Sekwencjonowanie bibliotek

Sekwencjonowanie bibliotek metodą sparowanych końców i z podwójnym indeksowaniem zostało wykonane przez firmę zewnętrzną CeGaT przy użyciu sekwenatora NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina). Warunki sekwencjonowania: odczyt 1 -28 cykli, indeks i7 – 10 cykli, indeks i5 – 10 cykli, odczyt 2 – 90 cykli. Podział z uwzględnieniem sekwencji znacznikowych odczytów sekwencjonowania został przeprowadzony za pomocą Illumina bcl2fastq (2.20). Otrzymane dane, już pozbawione sekwencji indeksów, w formacie FASTQ poddano analizie jakości przy użyciu programu FASTQC v0.11.8. Następnie używając programu spaceranger v1.2.2 (10x Genomics) wykonano: dopasowanie sekwencji odczytów do referencyjnej sekwencji genomu mysiego w wersji mm10 (GRCm38; „2020-A (June 23, 2020)”), przyporządkowanie tych odczytów do właściwych punktów pokrywających skrawki, zsumowanie liczby odczytów pojedynczych UMI, analizę skupień metodą k-średnich, wielowymiarowe statystyki (tSNE, UMAP) oraz analizy zróżnicowanego poziomu ekspresji genów między punktami należącymi do różnych klastrów. Dopasowanie odczytów do genomu referencyjnego nastąpiło poprzez implementację algorytmu programu STAR v2.7.2a

(Dobin et al., 2013). W pierwszej kolejności wykonano powyższe czynności dla każdej biblioteki osobno przy pomocy komendy `spaceranger count`, a w dalszym kroku dane wynikowe uzyskane dla wszystkich 4 próbek zagregowano komendą `spaceranger aggr`, aby utworzone klastry były uniwersalne względem wszystkich skrawków. Uzyskane w ten sposób dane zostały zwizualizowane w programie Loupe Browser v5.0 (10x Genomics).

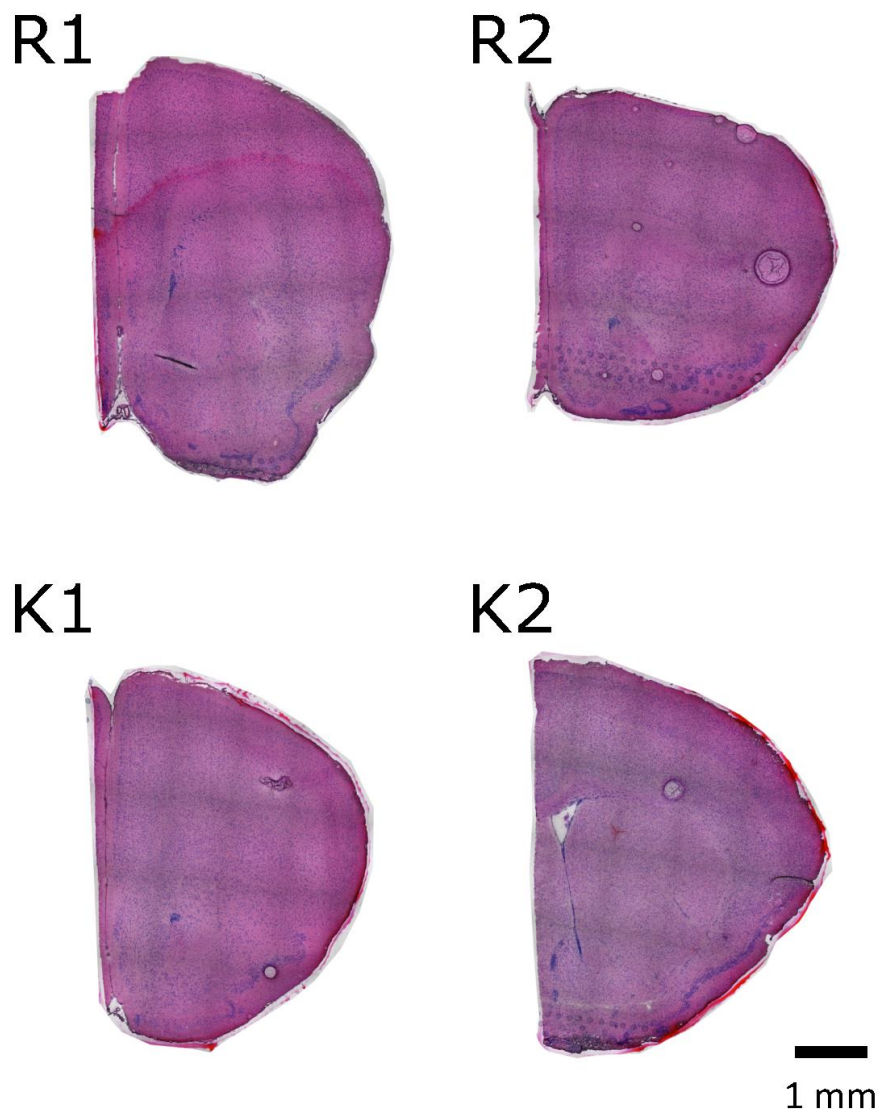
4. Wyniki

4.1 Przygotowanie bibliotek do transkryptomiki przestrzennej

Pierwszym etapem przestrzennej analizy transkrypcji genów była optymalizacja procedury permeabilizacji skrawków. Jest ona konieczna dla związania się mRNA ze starterami przyłączonymi do szkiełka. Mózgi zwierząt zostały zamrożone zgodnie z protokołem 10x Genomics w sposób opisany w punkcie 3.4. Preparacja tkanki. W kriostacie zostały przygotowane czołowe skrawki o grubości 10 μm , które natychmiast przenoszono na szkiełko do optymalizacji. Doświadczalnie, przy użyciu dedykowanego zestawu Visium Spatial Tissue Optimization Slide & Reagents Kit (10x Genomics, 1000193), ustalono optymalny czas permeabilizacji skrawków jako 16 min. Po ustaleniu zgodnie z protokołem warunków syntezy bibliotek, rozpoczęte zostało główne doświadczenie. Zwierzęta otrzymały rysperydon w dawce 0,5 mg/kg masy ciała. Dwie godziny później myszy zostały uśmiercone, mózgi zostały wypreparowane i zamrożone tak, jak w procedurze optymalizacji (punkt 3.4. Preparacja tkanki).

Następnie, aby zobrazować struktury mózgu przeprowadzono utrwalanie skrawków w metanolu oraz barwienie hematoksyliną i eozyną. Utrwalone i wybarwione skrawki (Rycina 3), których jakość została skontrolowana pod mikroskopem, stanowiły materiał wyjściowy do właściwej reakcji prowadzącej do uzyskania bibliotek do transkryptomiki przestrzennej (lub też do dalszej optymalizacji). Oznaczenia skrawków z obszarów aktywnych na szkiełku używanym do właściwej reakcji tworzenia bibliotek są następujące: R1 – mysz 1-2; R2 - mysz 2-2 – traktowane rysperydonem oraz K1 – mysz 2-3 i K2 – mysz 1-1 – zwierzęta kontrolne. W dalszej części opisu R1, R2, K1, K2 oznaczają odpowiednio próbki z tych obszarów aktywnych, po przeniesieniu materiału do probówek. Jak można zauważyć na Rycina 3, przekroje czołowe mózgu myszy zostały pobrane w różnej odległości od punktu bregma (od 1,18 mm do 1,98 mm). Skrawki są do siebie podobne, nie widać znaczących różnic w preparatyce ani wybarwieniu. W obrazie mikroskopowym można zaobserwować korę mózgową, kształt

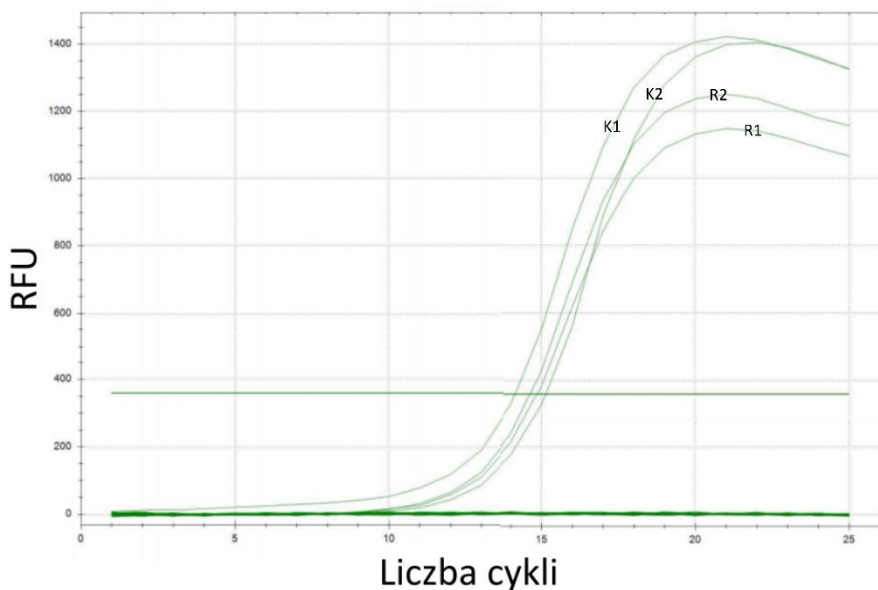
spoidła wielkiego, a pod nim prążkowie. Dobrze widoczna jest też kora gruszkowata. Na skrawku od zwierzęcia K2 widoczna jest jedna z komór bocznych mózgu. Znajdujące się w tle skrawków rzędy kropek to ramki referencyjne wytrawione na szkiełku do tworzenia bibliotek. Natomiast ślady linii są związane ze scalaniem obrazu mikroskopowego złożonego z segmentów przez program LASX.



Rycina 3 Skrawki czołowe z przodomózgowia myszy wybarwione hematoksyliną i eozyną. Odległość od punktu bregma: R1 – ok. 1,70 mm, R2 – ok. 1,98 mm, K1 – ok. 1,94 mm, K2 – ok. 1,18 mm. Skala znajduje się w prawym dolnym narożniku.

W następnym kroku przeprowadzono permeabilizację tkanki i przeniesiono materiał do probówek. Kolejnym etapem była odwrotna transkrypcja, synteza drugiej nici cDNA oraz jego liniowa amplifikacja. Oznaczenie ilości uzyskanego cDNA

przeprowadzono w wykorzystaniu ilościowego PCR (Rycina 4). Próg do określania wartości C_q był ustalany, zgodnie z zaleceniem producenta, w fazie wykładniczej wykresu amplifikacji przy ~25% maksymalnej wartości fluorescencji. Miarą ilości były cykle progowe (C_q), które wniosły odpowiednio 14,86, 14,63, 14,14 i 15,14 dla próbek R1, R2, K1 i K2. Liczbę cykli do przeprowadzonej następnie amplifikacji materiału za pomocą qPCR, wybrano zgodnie z protokołem 10x Genomics na podstawie zaokrąglenia wartości C_q do liczb całkowitych.



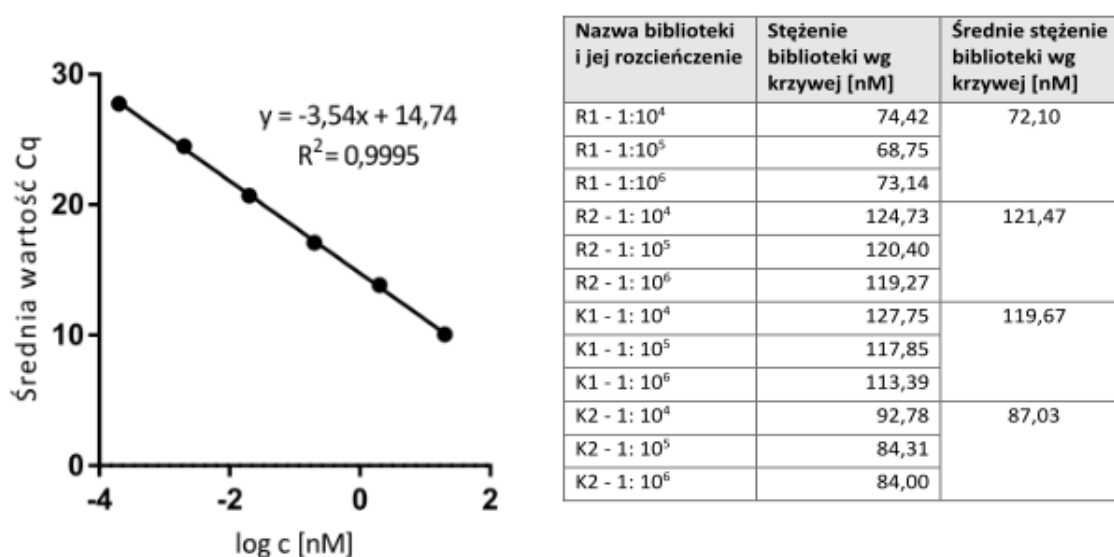
Rycina 4 Wybór liczby cykli reakcji qPCR do amplifikacji cDNA. Na osi rzędnych widoczny jest pomiar fluorescencji we względnych jednostkach fluorescencji (RFU), natomiast na osi odciętych liczba cykli w reakcji qPCR.

Po amplifikacji i oczyszczeniu za pomocą odczynnika SPRIselect przeprowadzono analizę uzyskanego materiału przy użyciu bioanalizatora (Tabela 7). Na podstawie uzyskanych wartości obliczono całkowitą uzyskaną ilość cDNA, dla poszczególnych próbek: R1 - 561, 6 ng, R2 – 452, 7 ng, K1 – 439, 8 ng i K2 – 490 ng.

Tabela 7 Wyniki kontroli jakościowej i pomiaru stężenia cDNA.

Próbka	Średni rozmiar fragmentu [pz]	Stężenie [ng/μl]
R1	980	14,041
R2	961	11,317
K1	989	10,995
K2	894	12,251

Tak otrzymane cDNA zostało użyte do konstrukcji bibliotek do badania przestrzennej ekspresji genów. Analizę długości cDNA w bibliotekach przeprowadzono za pomocą elektroforezy kapilarnej (czip Agilent Bioanalyzer High Sensitivity). Ustalono średnią wielkość fragmentów na podstawie odczytu z bioanalizatora: R1 - 448 pz, R2 - 422 pz, K1 - 442 pz, K2 - 429 pz (dla zakresu 250 -700 pz), którą przyjęto jako rozmiar konstruktów do kwantyfikacji bibliotek. Na podstawie średnich wartości Cq przeprowadzono regresję liniową (Rycina 5). Obliczono stężenia bibliotek w szeregu rozcieńczeń, a następnie dokonano jego korekty z uwzględnieniem średniej wielkości fragmentów oznaczonej w bioanalizatorze.

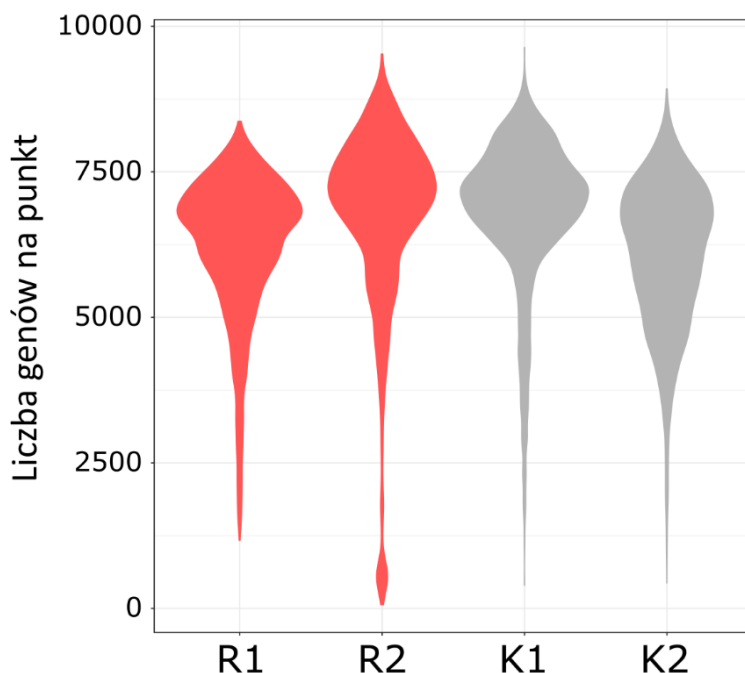


Rycina 5. Po stronie lewej krzywa standardowa z kwantyfikacji bibliotek cDNA za pomocą zestawu KAPA Library Quantification Kit, a po prawej podsumowanie oceny ilościowej bibliotek.

Średnie stężenie rozcieńczeń obliczono z wartości dla trzykrotnych powtórzeń każdego rozcieńczenia. Wartość współczynnika $R^2 \geq 0,99$, według zaleceń producenta zestawu odczynników KAPA Library Quantification Kit. Różnice w obliczonych stężeniach wyjściowych bibliotek nierozcieńczonych dla każdej próbki wynosiły od 0,95 do 12,7%. Uzyskany rozrzut stężeń był zbliżony do zaleceń producenta (<10%).

4.2 Wyniki sekwencjonowania

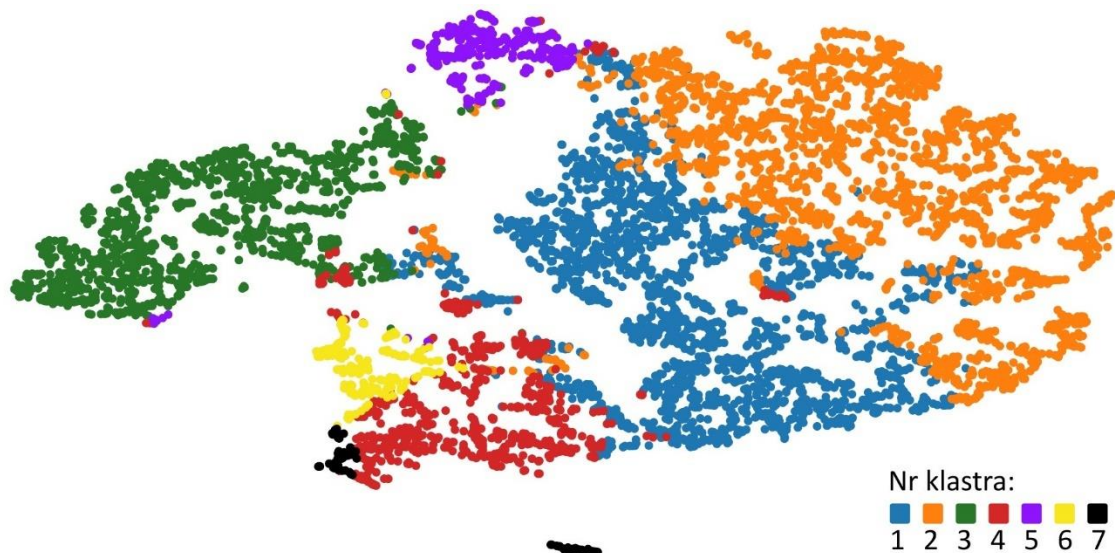
W celu sprawdzenia czułości metody przeprowadzono analizę liczby zidentyfikowanych genów na punkt dla każdego ze skrawków za pomocą R v4.1. Zostały wzięte pod uwagę wszystkie geny o większej od zera liczbie zliczeń, bez różnicowania między wariantami transkrypcyjnymi genu.



Rycina 6 Wykres skrzypcowy obrazujący rozkład liczb zidentyfikowanych genów na punkt dla każdego ze skrawków.

Jak można zauważyć rozkłady we wszystkich skrawkach są do siebie zbliżone, a uzyskane biblioteki mają podobną złożoność. Liczba zidentyfikowanych genów na punkt wyniosła średnio dla skrawków R1 – 6230, R2 – 6704, K1 - 6823, K2 – 6078 genów w jednym punkcie (mediany odpowiednio: R1 - 6546, R2 - 7080, K1 - 7051, K2 - 6268). Wynik potwierdza bardzo dobrą jakość uzyskanych bibliotek - w zestawieniu z udostępnionymi przez 10x Genomics zbiorami danych Visium, pozyskanymi również ze skrawków o grubości 10 μm : [Mouse Brain Serial Section 2 (Sagittal-Posterior)] z regionu hipokampa mózgu myszy, mediana wynosiła 4542 genów na punkt, natomiast dla [Mouse Brain Section (Coronal)] - 6018 genów na punkt.

Pierwszym krokiem opracowywania uzyskanych wyników była analiza skupień profilów transkrypcyjnych łącznie dla wszystkich punktów na wszystkich skrawkach. Wykorzystana została metoda k-średnich, wybrano $k=7$, gdyż przy tej liczbie skupień analiza wyraźnie rozdziela główne struktury widoczne na skrawkach. Na Rycina 7 pokazane jest podsumowanie analizy z wykorzystaniem t-SNE (z ang. *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*), który pozwala na dwuwymiarową projekcję odległości między punktami.

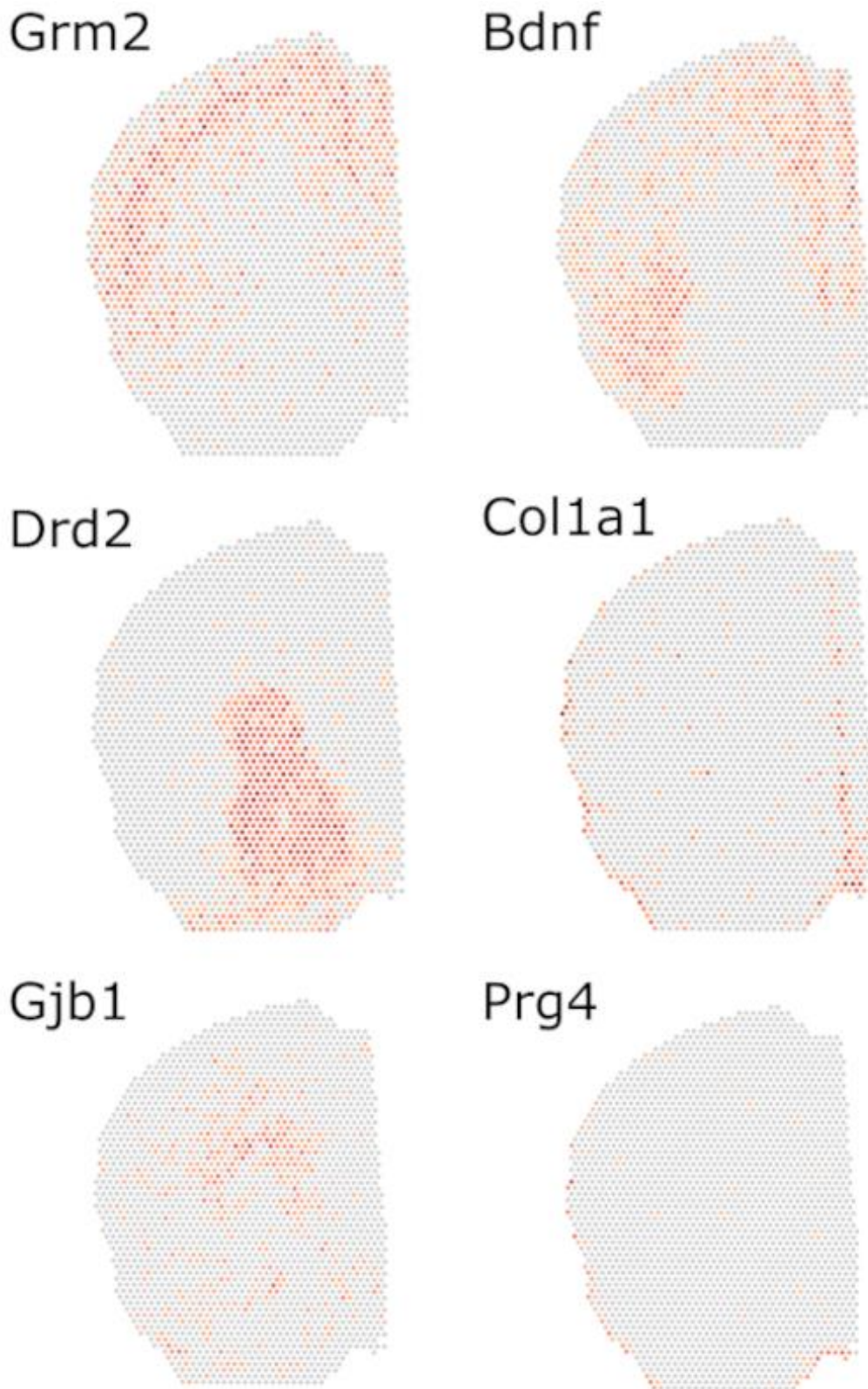


Rycina 7 Schemat t-SNE wyniku analizy skupień metodą k-średnich przy $k = 7$.

Na powyższej rycinie widać, że skupienia 1-6 są wyraźnie rozdzielne od siebie. Najwięcej punktów liczą: **klaster 1** - 2337 punktów, **klaster 2** - 2321 punktów oraz **klaster 3** – 1320 punktów. Znacznie mniej **klaster 4** - 722 punkty, **klaster 5** – 313 punktów oraz **klaster 6** – 203 punkty. Klaster 7 nie tworzy spójnego, odrębnego skupienia i zawiera jedynie 97 punktów. Najprawdopodobniej są to punkty o profilu transkrypcyjnym za mało swoistym dla pozostałych klastrów, w których profile ekspresji w poszczególnych punktach są charakterystyczne dla struktury mózgu w której leżą. Celem zobrazowania tej przestrzennej specyficzności na *Rycina 8* zaprezentowano przestrzenne ułożenie klastrów na skrawkach.

to część preparatu poza obszarem aktywnym szkiełka). Dlatego też profile ekspresji pojedynczych genów zostały naniesione i porównywane przede wszystkim na skrawkach R1 i K2.

Na *Rycina 9* pokazano przykłady genów, których ekspresja znamienne różnicowała dany klaster od pozostałych zgodnie z analizą skupień przeprowadzoną przez program spaceranger v1.2.2 (10x Genomics). Nie zamieszczono panelu dla klastra 7, ponieważ jak wspomniano wyżej z racji na wybór metody analizy skupień metodą k-średnich, klaster ten stanowi zbiór punktów, które nie wykazywały profilu ekspresji specyficznej dla żadnego innego skupienia.



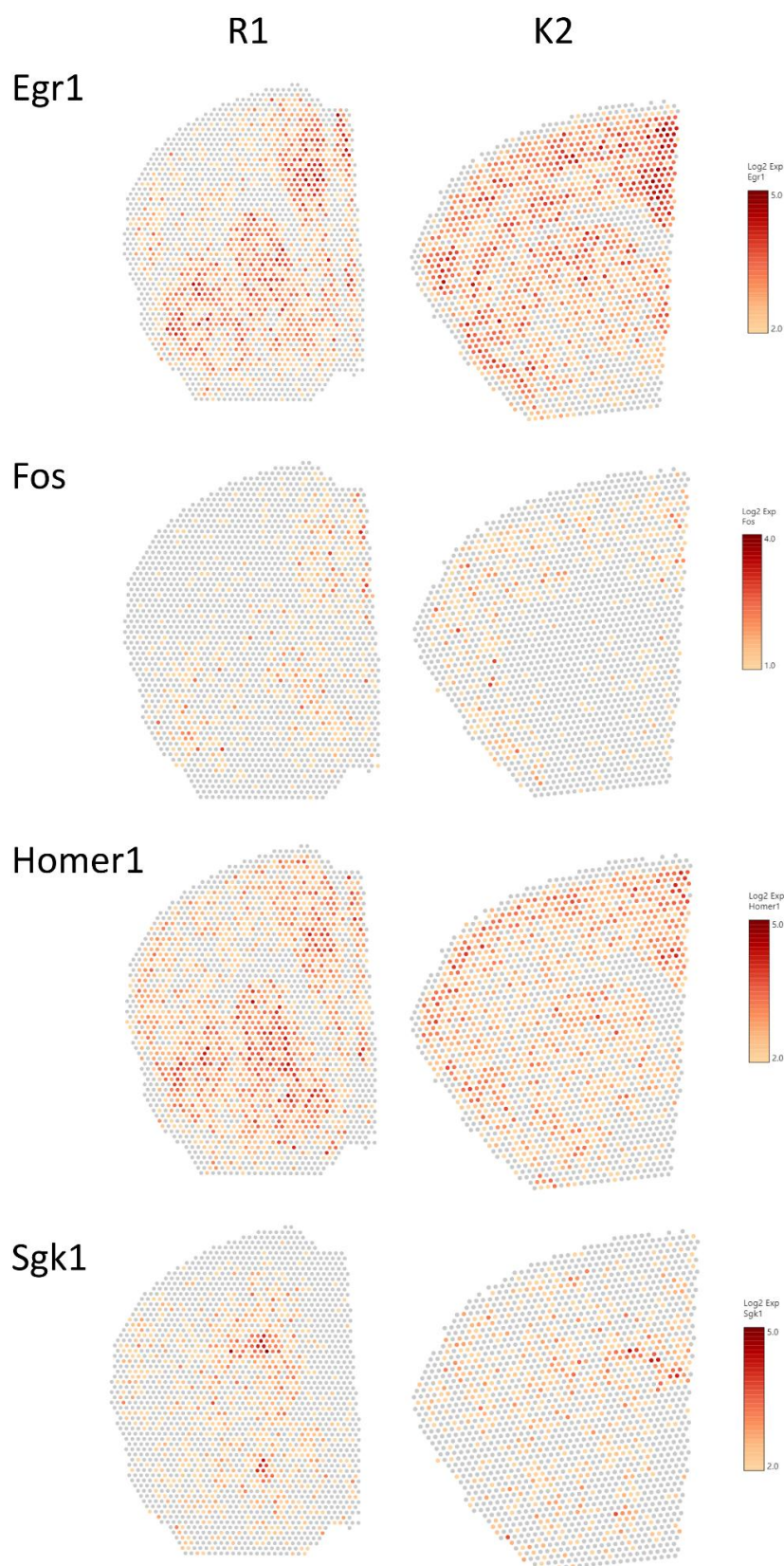
Rycina 9 Przykłady genów o profilach transkrypcyjnych charakterystycznych dla klastrów 1-6 uwidocznione na skrawku R1. Od lewego górnego panelu odpowiednio: *Grm2* – *klaster 1*, *Bdnf* – *klaster 2*, *Drd2* – *klaster 3*, *Col1a1* – *klaster 4*, *Gjb1* – *klaster 5*, *Prg4* – *klaster 6*. Natężenie koloru jest proporcjonalnie do ilości transkryptów mRNA w danym punkcie.

Wybrano po jednym przykładzie genu o wzorze ekspresji charakterystycznym dla klastrów 1-6 i jednocześnie dla struktur mózgowych, którym te skupienia odpowiadają. Jako znacznik dla **klastra 1** pokazano *Grm2*, czyli metabotropowy receptor glutaminianu 2, którego największą liczbę transkryptów stwierdzono w górnych warstwach kory mózgowej. Z kolei w warstwach przyśrodkowych, które obejmuje **klaster 2**, szczególnie widoczna jest ekspresja neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (*Bdnf*). **Klaster 3**, którego markerem jest *Drd2* (receptor dopaminowy D2), obejmuje cały obszar prążkowiec widoczny w tej odległości od bregmy (ok. 1,70 mm).

W odróżnieniu od pierwszych trzech klastrów, które odpowiadają obszarom w których przeważają neurony, w kolejnych klastrach (4, 5 i 6), wyrażane są przede wszystkim geny, co do których wcześniejsze doniesienia wskazują, że ich ekspresja zachodzi w komórkach innych niż nerwowe. *Coll1a1* (łańcuch kolagenu alfa-1(I)) to gen kodujący białko będące głównym składnikiem kolagenu typu I budującego tkanki łączne. Z kolei *Gjbl*, gen kodujący białko beta-1 połączenia szczelinowego, to inaczej koneksyna 32 należąca do rodziny białek tworzących złącza szczelinowe. Natomiast całkiem peryferycznie (przyległe do opon mózgowych i czaszki) stwierdzono ekspresję lubrycyny (*Prg4*; proteoglikan 4), która wchodzi w skład płynu stawowego i odpowiada za tworzenie warstwy ochronnej na powierzchni chrząstki. Powyższe profile uzyskane techniką transkryptomiki przestrzennej korespondują z obrazami ekspresji tych genów uzyskanymi przy użyciu hybrydyzacji *in situ* (Allen Mouse Brain Atlas, 2004: *Grm2* - RP_071204_04_E09 – coronal; *Bdnf* - RP_071204_02_D03 – coronal; *Drd2* - RP_Baylor_102735 – coronal; *Coll1a1* - RP_051012_04_B03 – sagittal; *Gjbl* - RP_050331_02_D03 – sagittal; *Prg4* - RP_060608_03_D01 – sagittal). Przedstawione przykłady dobrze ilustrują przestrzenną specyficzność tej metody.

Po ustaleniu, że obraz uzyskany z danych transkryptomicznych odpowiada strukturalnej budowie przekrojów mózgu, starano się sprawdzić czy występują zmiany w ekspresji genów po podaniu rysperydonu. Z uwagi na małą liczbę przeanalizowanych skrawków nie zamieszczono wyników analizy statystycznej. Dodatkowo, skrawki zostały pobrane w różnych odległościach od bregmy, przez co nawet jeśli analiza skupień poprawnie przypisała główne widoczne na nich struktury, ich proporcje i skład komórkowy nie są identyczne. W celu przeprowadzenia wstępnej ewaluacji efektów podania leku na zmiany transkrypcyjne, wybrano szereg genów, które ulegały indukcji we wcześniej opublikowanych badaniach. W szczególności, skupiłam się na genach związanych z odpowiedzią wczesną – *Egr1*, *Fos*, *Homer1*, *Sgk1*, w przypadku których

stwierdzano zmiany w poziomie transkrypcji po podaniach leków antypsychotycznych drugiej generacji. Na *Rycinie 11* zestawiono obrazy ekspresji poszczególnych genów u myszy eksperymentalnej - R1 oraz kontrolnej - K2. Jak wspomniano, w wyborze zestawionych skrawków kierowano się przede wszystkim jakością skrawka tak, aby widoczne były te same struktury, w szczególności kora i prążkowie, w których spodziewano się zaobserwować zmiany w ekspresji genów na podstawie wyników dotychczasowych badań.



Rycina 10 Profile ekspresji wybranych genów: Egr1, Fos, Homer1 i Sgk1 o lokalnej transkrypcji indukowanej rysperydonem. Po stronie lewej zaprezentowane na skrawku od zwierzęcia eksperymentalnego - R1, a po prawej od kontrolnego - K2. Natężenie koloru jest proporcjonalnie do ilości transkryptów mRNA w danym punkcie.

Ekspresję *Egr1* zaobserwowano w korze, a szczególnie silnie w przyśrodkowych jej regionach oraz w grzbietowych częściach prążkowie, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (De Bartolomeis et al., 2017, 2015; Zygmunt et al., 2018). Po 2h od podania rysperydonu indukcja tego genu następuje prawdopodobnie w brzusznych częściach prążkowie i przyśrodkowych częściach kory. Podobny wzór ekspresji zaobserwowano dla *Homer1* (De Bartolomeis et al., 2017; Polese et al., 2002). W przypadku *Fos* widać, że bazowa ekspresja jest względnie dużo niższa, a po podaniu leku prawdopodobnie następuje indukcja transkrypcji w prążkowie, co również jest zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi rysperydonu jak i innych atypowych antypsychotyków (Deutch i Duman, 1996; Wan et al., 1995; Werme et al., 2000). Odmienne względem pozostałych genów ekspresja *Sgk1* widoczna jest w obszarach złożonych w głównej mierze z komórek gleju. Zmiany ekspresji odpowiadają obszarom spoidła wielkiego oraz przedniego i potwierdzają wcześniejsze obserwacje (Zygmunt et al., 2018).

5. Dyskusja

W toku prowadzenia badań opisanych w niniejszej pracy najpierw wdrożono metodykę transkryptomiki przestrzennej Visium Spatial Gene Expression opracowaną przez 10x Genomics. Po kolei optymalizowano sposób preparowania i zamrażania mózgów, a potem czasy barwienia i permeabilizacji tkanki na materiale kontrolnym. Przed wykonaniem właściwego eksperymentu ustalono warunki syntezy bibliotek. Główną część badania stanowił eksperyment z udziałem 4 myszy C57BL/6, z których 2 otrzymały pojedynczą, dawkę leku antypsychotycznego drugiej generacji – rysperydonu. Pojedyncze skrawki mózgów mysich wykorzystano do syntezy bibliotek cDNA. Otrzymane w wyniku całej procedury biblioteki wysłano do sekwencjonowania przez firmę zewnętrzną. Na uzyskanych wynikach sprawdzono użyteczność metody do dalszych badań i przeprowadzono pilotażowy test efektywności tej techniki w analizie różnicowej ekspresji genów po interwencji eksperymentalnej, jaką stanowiło podanie leku. Zaobserwowano lokalne zmiany w profilach transkrypcyjnych wielu genów w korze przedczołowej i prążkowie. Wybrano kilka przykładów genów wczesnych - *Egr1*, *Fos*, *Homer1* i *Sgkl* do zaprezentowania tych zmian. Zrealizowano zatem cele związane z wdrożeniem metodyki i uchwyceniem przestrzennych zmian profili transkrypcyjnych.

Uzyskane wyniki dobrze obrazują neuroanatomiczne zróżnicowanie struktur mózgu. Stanowią one uproszczony obraz, tego co otrzymywali ze skrawków Ortiz i współpracownicy (2020) konstruując Molekularny atlas dorosłego mózgu mysiego (Molecular atlas of the adult mouse brain, <https://molecularatlas.org/>). Dowiedli oni, że dane transkryptomikowe są wystarczające do odtworzenia złożonej i szczegółowej organizacji neuroanatomicznej w skali całego mózgu. Oparta na danych, nietendancyjna klasyfikacja punktów i niehierarchiczna analiza skupień (np. metodą k-średnich) pozwala na charakterystykę przestrzennej tożsamości komórek i wyodrębnienie obszarów mózgu na podstawie ich profilu ekspresji genów. Dzięki temu możliwy jest molekularny opis zarówno dla szeroko badanych obszarów mózgu jak kora sensoryczna i motoryczna czy hipokamp, ale też dla ważnych struktur o słabo zdefiniowanych do tej pory podziałach wewnętrznych jak grzbietowa część prążkowie. W toku pracy nad wynikami z niniejszego badania ustalono, że po udoskonaleniu metody klastrowania, ich jakość również pozwoli na stworzenie bardziej dokładnego i szczegółowego obrazu struktur mózgu jak np. osobnych skupień dla różnych warstw kory mózgowej.

Istnieje wiele atlasów mózgu dla różnych zwierząt modelowych (jak chociażby wcześniej wspomniane - Atlas mózgu mysiego Paxinosa i Franklina (2001) i Atlas mózgu mysiego Instytutu Allena (2004)), a także dla człowieka (np. Atlas mózgu ludzkiego Instytutu Allena (2010)). Mimo to, nurt odkryć neuroanatomicznych pozostaje żywym i rozwojowym kierunkiem badawczym. Proces powstawania atlasu Ortiz i wsp. (2020) ujawnił np. nowy podział podregionów w prążkowie grzbietowym i dostarczył dowodów na odrębną tożsamość molekularną różnych części warstwy 2/3 w korze nowej. Ponadto uzyskane dane sugerują potrzebę nowej klasyfikację podregionów korowych na wymiarze przednio-tylnym i przyśrodkowo-bocznym. Wiele obszarów, korowych do tej pory uważanych za posiadające kompletne mapy topograficzne, spójną architekturę wewnętrzną oraz wspólne charakterystyki połączeń nerwowych i funkcji, wykazuje mozaikowe wewnętrzne zróżnicowanie. Przykładem są różnice w aktywacji oraz funkcjonalnej łączności wczesnych obszarów czuciowych i motorycznych, których niejednorodność została zaobserwowana zarówno u myszy, jak i naczelnych (Van Essen i Glasser, 2018). Sama definicja regionu lub obszaru w mózgu jest zaskakująco niejasna, a różnice w podejściu eksperymentalnym i klasyfikacyjnym zaowocowały różniącymi się podziałami (Bota, Dong i Swanson, 2003; Ortiz, Carle i Meletis, 2021). Molekularny atlas dorosłego mózgu mysiego opisuje tożsamość komórkową i przestrzenną warstw kory nowej (w tym sensorycznej i motorycznej), obszarów węchowych (np. kora gruszkowata czy obszaru zahipokampowego (jak np. obszar śródwęchowy)). Rozdział tych obszarów na konkretne warstwy i sposób w jaki ten podział warstwowy jest zachowany w różnych obszarach nie był do tej pory jasny i pozostawał przedmiotem debaty (Narayanan et al., 2017).

Poleganie na obrazach mikroskopowych i innych dotychczasowych metodach użytych do tworzenia atlasów mózgu prowadzi do sporów i wątpliwości odnośnie dokładności opisów regionów oraz wyznaczania granic struktur opartych na opiniach eksperckich. Nawet nieco odmienne definiowanie i określanie granic obszarów prowadzi z kolei do różnej interpretacji wyników eksperymentalnych i braku możliwości ich integracji. Zostały zaproponowane cztery podstawowe kategorie neurobiologiczne do dokładniejszego określania obszarów korowych: funkcja, budowa, sieć połączeń i/lub topografia. Ten zbiór kategorii w skrócie określanej jako FACT (Function, Architecture, Connectivity, and/or Topographic organization) może być używany również do charakteryzowania innych regionów mózgu. Niemożliwe jest natomiast opisywanie tych cech jedynie korzystając z metod powierzchniowej wizualizacji struktur, ani metod

pozwalających na badanie tylko wybranej grupy genów (Van Essen i Glasser, 2018). Dotychczasowe metody badawcze osiągnęły dokładność i czułość wystarczającą do wykrycia transkryptów mRNA zlokalizowanych nie tylko w pojedynczych komórkach (np. scRNAseq) ale nawet w domenach subkomórkowych (np. smFISH), co pozwoliło na stworzenie spisów typów komórek tworzących układ nerwowy. Teraz akcentuje się konieczność sformułowania bardziej jednoznacznych, opartych na wzorach molekularnych definicji do opisu struktur tego układu. Natomiast transkryptomika przestrzenna została porównana do Kamienia z Rosetty jako metoda pozwalająca uzyskać dane o tożsamości molekularnej i położeniu przestrzennym, ale też połączyć je z informacjami o strukturze połączeń nerwowych, morfologii i topografii typów komórek. Jest to kolejny duży krok na drodze do kompleksowego zrozumienia funkcjonalności obwodów mózgu (Close, Long i Zeng, 2021). Funkcjonowanie mózgu w stanach fizjologicznych i jego złożony obraz molekularny stanowi z kolei podstawę do porównań z zaburzeniami czynności oraz na poziomie cząsteczkowym, które mają miejsce w stanach patologicznych (deprywacja snu, choroby układu nerwowego). Jest to również odniesienie do zmian funkcjonalnych i molekularnych powodowanych przyjmowaniem leków i innych substancji psychoaktywnych.

Jak dotąd nie ma jeszcze doniesień literaturowych, w których opisano zastosowanie transkryptomiki przestrzennej w badaniu mechanizmów działania leków. W opisywanym w tej pracy eksperymencie badano wpływ rysperydonu na zmiany w całym transkryptomie. Zastosowanie tej metody wydaje się naturalnym przedłużeniem badań nad lekami i innymi substancjami, które podobnie jak rysperydon wykazują specyficzne działanie ograniczone do pewnych regionów mózgu (De Bartolomeis et al., 2017; Sumner et al., 2004). Podjęto próbę globalnej analizy zmian transkrypcji wszystkich zidentyfikowanych genów, aby możliwe były porównania zmian ekspresji w poszczególnych klastrach i punktach ze skrawków pobranych od różnych zwierząt, która jednak okazała się wyzwaniem na gruncie bioinformatycznym. W toku opracowywania wyników nie została jeszcze przeprowadzona całościowa analiza statystyczna efektów działania leku. Potencjalna metoda analizy wpływu podania leku na zmiany ekspresji genów prawdopodobnie będzie wymagała porównania liczby zliczeń transkryptów w każdym z punktów oraz w każdym klastrze. Obecnie kontynuowane są prace mające na celu rozwiązanie napotkanych problemów. Trudności wiążą się z różną odległością skrawków od bregmy, a przez to różnym składem tkankowym, różną liczbą punktów przypadających na ten sam klaster w poszczególnych skrawkach oraz

dominującym efektem różnic między skupieniami (różnice neuroanatomiczne), który utrudnia analizowanie wpływu leku (eksperymentalna indukcja ekspresji). Opracowywane są również udoskonalone metody normalizacji między poszczególnymi skrawkami oraz między klastrami. Jak wspomniano analiza skupień również jest przedmiotem dalszej optymalizacji tak, aby wyodrębnić w obrazie więcej detali neuroanatomicznych, a następnie móc uchwycić znacznie bardziej subtelne, przestrzenne zmiany poziomu ekspresji genów wiążące się z działaniem leku.

W oparciu o dotychczas przeprowadzone analizy nie jest jeszcze możliwa funkcjonalna analiza procesów związanych z działaniem leku w różnych strukturach mózgu. Natomiast nie zapewniają tego również dotychczasowe metody badań jak np. ciągle rozwijana i udoskonalana technologia sekwencjonowania pojedynczych komórek (scRNAseq). Pozwala ona zidentyfikować i scharakteryzować zarówno znane, jak i nowe typy komórek. Dzięki temu możliwy jest wgląd w złożone mechanizmy wewnątrzkomórkowe. Jednakże o oddziaływaniach między komórkami można wnioskować jedynie pośrednio opierając się na wiedzy dostępnej na temat interakcji różnych ligandów i receptorów. Natomiast dodanie aspektu przestrzennego pozwala ustalić tkankową tożsamość komórek i analizować ich profile transkrypcyjne pod kątem oddziaływań między populacjami komórek w warunkach fizjologicznych i patologicznych oraz w obrębie jednej lub kilku struktur biorących udział w danym procesie. Koordynaty przestrzenne komórek prawdopodobnie są krytyczną informacją dla ustalenia w jakich oddziaływaniach biorą one udział, jaka jest trajektoria i kierunek szlaków komunikacyjnych między nimi. Wskazuje się także na potrzebę opracowania nowych narzędzi i metod analiz, które pozwolą na systemową integrację danych transkryptomicznych z informacjami o cechach morfologicznych widocznych na obrazach histologicznych (He et al., 2020; Larsson et al., 2021).

Ponieważ warunkach w fizjologicznych transkrypcja, jak i wszystkie inne procesy zachodzące w komórce, jest regulowana nie tylko za pomocą sygnałów wewnątrzkomórkowych, lecz także oddziaływań międzykomórkowych i innych bodźców odbieranych z otaczającego środowiska. W organizmach wielokomórkowych zespoły podobnych strukturalnie i funkcjonalnie komórek budują tkanki, te składają się na narządy, które można pogrupować na układy narządów razem tworzące strukturalną i funkcjonalną całość organizmu. Kluczowym wydaje się badanie komórki w jak najlepiej zachowanym biologicznym kontekście ponieważ właśnie w warunkach nieustającej komunikacji z innymi komórkami oraz odbierania różnego rodzaju

informacji z otaczającego środowiska zachodzi cykl komórkowy, różnicowanie czy procesy śmierci komórkowej. Również w kontekście populacji komórek, tkanek i narządów zachodzą procesy związane z rozwojem organizmu, działaniem bodźców zewnętrznych (takich jak podanie leku), czy starzeniem się i śmiercią organizmu.

W wyniku eksperymentu opisanego w niniejszej pracy uzyskano ilościowe dane transkryptomyczne wraz z informacją o przestrzennej lokalizacji w tkance obszaru, gdzie dany transkrypt był wyrażany. Uzyskane wyniki nie pozwalają na przeprowadzenie porównań statystycznych, ze względu na to, że w badaniu pilotażowym brała udział mała liczba zwierząt. Otrzymano natomiast dane o wysokim poziomie wewnętrznej złożoności, które podlegają dalszemu opracowaniu. Można natomiast obserwować profile ekspresji pojedynczych genów, jakie zostały wykryte w każdym ze skrawków oraz porównywać te profile w skali całych skrawków, opisywać charakterystykę poszczególnych klastrów pod względem abundancji mRNA wszystkich wykrytych w nich transkryptów. Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczne wykorzystanie metody i jej przydatność do dalszych badań oraz stanowią materiał do rozwijania metod analiz tych danych. Zastosowana w badaniu technika transkryptomiki przestrzennej wpisuje się w jedno z najnowszych podejść do badania ekspresji genów. Metoda ta łączy wizualizację i analizę ilościową transkryptomu z rozdzielczością przestrzenną w poszczególnych skrawkach. Transkryptomika przestrzenna oraz opisane niżej możliwości badań przy jej pomocy zostały uznane *Nature Methods* za doniosły kierunek w rozwoju nauk o życiu i wybrane na Metodę Roku 2020 (Marx, 2021). Wartość dodana badań przy użyciu tej metodyki leży nie tyle w samej możliwości opisywania ekspresji genów na kolejnym (przestrzennym) wymiarze, ale w zwiększonej tym sposobem trafności całego pomiaru.

6. Bibliografia

- © 2004 Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas. Dostępne pod adresem: mouse.brain-map.org
- © 2010 Allen Institute for Brain Science. Allen Human Brain Atlas. Dostępne pod adresem: human.brain-map.org
- Adriani, W., Leo, D., Greco, D., Rea, M., Di Porzio, U., Laviola, G., Perrone-Capano, C., 2006. Methylphenidate administration to adolescent rats determines plastic changes on reward-related behavior and striatal gene expression. *Neuropsychopharmacology* 31, 1946–1956. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300962>
- Barco, A., Bailey, C.H., Kandel, E.R., 2006. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J. Neurochem.* 97, 1520–1533. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03870.x>
- Beckmann, A.M., Wilce, P.A., 1996. Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem. Int.* 31, 511–516. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(97\)00001-6](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(97)00001-6)
- Bota, M., Dong, H.W., Swanson, L.W., 2003. From gene networks to brain networks. *Nat. Neurosci.* 6, 795–799. <https://doi.org/10.1038/nn1096>
- Chaudhury, S., Sharma, V., Kumar, V., Nag, T.C., Wadhwa, S., 2016. Activity-dependent synaptic plasticity modulates the critical phase of brain development. *Brain Dev.* 38, 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2015.10.008>
- Close, J.L., Long, B.R., Zeng, H., 2021. Spatially resolved transcriptomics in neuroscience. *Nat. Methods* 18, 23–25. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01038-7>
- Crespo-Facorro, B., Prieto, C., Sainz, J., 2014. Schizophrenia gene expression profile reverted to normal levels by antipsychotics. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, 1–7. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu066>
- De Bartolomeis, A., Buonaguro, E.F., Latte, G., Rossi, R., Marmo, F., Iasevoli, F., Tomasetti, C., 2017. Immediate-early genes modulation by antipsychotics: Translational implications for a putative gateway to drug-induced long-term brain changes. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00240>
- De Bartolomeis, A., Iasevoli, F., Marmo, F., Buonaguro, E.F., Eramo, A., Rossi, R., Avvisati, L., Latte, G., Tomasetti, C., 2015. Progressive recruitment of cortical and striatal regions by inducible postsynaptic density transcripts after increasing doses of antipsychotics with different receptor profiles: Insights for psychosis treatment. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25, 566–582. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.01.003>
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dugger, S.A., Platt, A., Goldstein, D.B., 2018. Drug development in the era of precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 183–196. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.226>
- Fenton, C., Scott, L.J., 2005. Risperidone: A review of its use in the treatment of bipolar mania. *CNS Drugs* 19, 429–444. <https://doi.org/10.2165/00023210-200519050-00005>
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition, Academic Press.
- Gallo, F.T., Katche, C., Morici, J.F., Medina, J.H., Weisstaub, N. V., 2018. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00079>
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S., Kandel, E.R., 1986. The long and the short of long-term memory - A molecular framework. *Nature* 322, 419–422. <https://doi.org/10.1038/322419a0>
- Grassi-Zucconi, G., Bentivoglio, M., 1998. Immediate Early Gene Expression in Sleep and Wakefulness, in: *Handbook of Behavioral State Control*. CRC Press, pp. 235–253. <https://doi.org/10.1201/9781420048247.ch15>
- Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A., 1986. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* (80-.). 234, 80–83. <https://doi.org/10.1126/science.3749894>
- Gunther, E.C., Gerwien, R.W., 2004. Resolution of cellular physiology by genomic expression signature analysis: Bridging the content gap between in vitro and in vivo drug development. *Drug Dev. Res.* 62, 119–123. <https://doi.org/10.1002/ddr.10374>
- Gunther, E.C., Stone, D.J., Gerwien, R.W., Bento, P., Heyes, M.P., 2003. Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9608–9613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1632587100>
- Guzowski, J.F., 2002. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12, 86–104. <https://doi.org/10.1002/hipo.10010>

- He, B., Bergensträhle, L., Stenbeck, L., Abid, A., Andersson, A., Borg, Å., Maaskola, J., Lundeberg, J., Zou, J., 2020. Integrating spatial gene expression and breast tumour morphology via deep learning. *Nat. Biomed. Eng.* 4, 827–834. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-0578-x>
- Hong, Y., Kim, W.J., Bang, C.Y., Lee, J.C., Oh, Y.M., 2016. Identification of alternative splicing and fusion transcripts in non-small cell lung cancer by RNA sequencing. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. 79, 85–90. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.85>
- Huber, D., Voith von Voithenberg, L., Kaigala, G. V., 2018. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? *Micro Nano Eng.* 1, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.mne.2018.10.006>
- Hyman, S.E., Nestler, E.J., 1996. Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action February, 151–162.
- Kandel, E.R., 2001. *The Molecular Dialogue Biology of Memory and Storage : Synapses Between Genes* 294, 1030–1038.
- Kandel, E.R., Spencer, W.A., 1968. Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiol. Rev.* 48, 65–134. <https://doi.org/10.1152/physrev.1968.48.1.65>
- Korostyński, M., Piechota, M., Dzbek, J., Młynarski, W., Szklarczyk, K., Ziolkowska, B., Przewlocki, R., 2013. Novel drug-regulated transcriptional networks in brain reveal pharmacological properties of psychotropic drugs. *BMC Genomics* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-606>
- Kuruba, K.R., Montgomery, S.B., 2015. RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015, 951–969. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Lanahan, A., Worley, P., 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 37–43. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3836>
- Larsson, L., Frisén, J., Lundeberg, J., 2021. Spatially resolved transcriptomics adds a new dimension to genomics. *Nat. Methods* 18, 15–18. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01038-7>
- Lewis, D.A., González-Burgos, G., 2008. Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 33, 141–165. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301563>
- Manning, C.E., Williams, E.S., Robison, A.J., 2017. Reward network immediate early gene expression in mood disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00077>
- Mantione, K.J., Kream, R.M., Kuzelova, H., Ptacek, R., Raboch, J., Samuel, J.M., Stefano, G.B., 2014. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 20, 138–142. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.892101>
- Marder, S.R., Meibach, R.C., 1994. Risperidone in the treatment of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 151, 825–835. <https://doi.org/10.1176/ajp.151.6.825>
- Martin, J.A., Wang, Z., 2011. Next-generation transcriptome assembly. *Nat. Rev. Genet.* 12, 671–682. <https://doi.org/10.1038/nrg3068>
- Marx, V., 2021. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics. *Nat. Methods* 18, 9–14. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01033-y>
- Mauri, M.C., Paletta, S., Maffini, M., Colasanti, A., Dragogna, F., Di Pace, C., Altamura, A.C., 2014. Clinical pharmacology of atypical antipsychotics: An update. *EXCLI J.* 13, 1163–1191.
- McClung, C.A., Nestler, E.J., 2008. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology* 33, 3–17. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301544>
- Morozova, O., Hirst, M., Marra, M.A., 2009. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 135–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-145957>
- Narayanan, R.T., Udvary, D., Oberlaender, M., 2017. Cell type-specific structural organization of the six layers in rat barrel cortex. *Front. Neuroanat.* 11, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00091>
- Ortiz, C., Carle, M., Meletis, K., 2021. Spatial Transcriptomics: Molecular Maps of the Mammalian Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 44, 547–562. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-100520-082639>
- Ortiz, C., Navarro, J.F., Jurek, A., Martín, A., Lundeberg, J., Meletis, K., 2020. Molecular atlas of the adult mouse brain. *Sci. Adv.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb3446>
- Pérez-Cadahía, B., Drobnic, B., Davie, J.R., 2011. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem. Cell Biol.* 89, 61–73. <https://doi.org/10.1139/O10-138>
- Piechota, M., Golda, S., Ficek, J., Jantas, D., Przewlocki, R., Korostyński, M., 2015. Regulation of alternative gene transcription in the striatum in response to antidepressant drugs. *Neuropharmacology* 99, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.006>
- Polese, D., De Serpis, A.A., Ambesi-Impiomato, A., Muscettola, G., De Bartolomeis, A., 2002. Homer 1a gene expression modulation by antipsychotic drugs: Involvement of the glutamate metabotropic system and effects of D-cycloserine. *Neuropsychopharmacology* 27, 906–913. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00371-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00371-8)
- Rebelo, D., Oliveira, F., Abrunhosa, A., Januário, C., Lemos, J., Castelo-Branco, M., 2021. A link between

- synaptic plasticity and reorganization of brain activity in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013962118>
- Schafe, G.E., Nader, K., Blair, H.T., LeDoux, J.E., 2001. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: A cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.* 24, 540–546. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01969-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01969-X)
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* (80-.). 270, 467–470. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>
- Schirinzi, T., Madeo, G., Martella, G., Maltese, M., Picconi, B., Calabresi, P., Pisani, A., 2016. Early synaptic dysfunction in Parkinson's disease: Insights from animal models. *Mov. Disord.* 31, 802–813. <https://doi.org/10.1002/mds.26620>
- Sheng, M., Greenberg, M.E., 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4, 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
- Ståhl, P.L., Salmén, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J.F., Magnusson, J., Giacomello, S., Asp, M., Westholm, J.O., Huss, M., Mollbrink, A., Linnarsson, S., Codeluppi, S., Borg, Å., Pontén, F., Costea, P.I., Sahlén, P., Mulder, J., Bergmann, O., Lundberg, J., Frisén, J., 2016. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* (80-.). 353, 78–82. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2403>
- Stahl, S.M., 2000. *Essential psychopharmacology: Neuroscientific basis and practical applications.* Cambridge university press. <https://doi.org/10.1017/s0033291708005060>
- Stark, R., Grzelak, M., Hadfield, J., 2019. RNA sequencing: the teenage years. *Nat. Rev. Genet.* 20, 631–656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>
- Streit, S., Michalski, C.W., Erkan, M., Kleeff, J., Friess, H., 2009. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat. Protoc.* 4, 37–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.216>
- Sumner, B.E.H., Cruise, L.A., Slattery, D.A., Hill, D.R., Shahid, M., Henry, B., 2004. Testing the validity of c-fos expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs. *Psychopharmacology (Berl.)* 171, 306–321. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1579-7>
- Sumner, B.E.H., Cruise, L.A., Slattery, D.A., Hill, D.R., Shahid, M., Henry, B., 2003. Testing the validity of c-fos expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs. *Psychopharmacology (Berl.)* 171, 306–321. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1579-7>
- Tyssowski, K.M., DeStefino, N.R., Cho, J.H., Dunn, C.J., Poston, R.G., Carty, C.E., Jones, R.D., Chang, S.M., Romeo, P., Wurzelmann, M.K., Ward, J.M., Andermann, M.L., Saha, R.N., Dudek, S.M., Gray, J.M., 2018. Different Neuronal Activity Patterns Induce Different Gene Expression Programs. *Neuron* 98, 530-546.e11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.001>
- Van Essen, D.C., Glasser, M.F., 2018. Parcellating Cerebral Cortex: How Invasive Animal Studies Inform Noninvasive Mapmaking in Humans. *Neuron* 99, 640–663. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.002>
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler*, K.W., 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* (80-.). 270, 484–487.
- Wang, Y., Mashock, M., Tong, Z., Mu, X., Chen, H., Zhou, X., Zhang, H., Zhao, G., Liu, B., Li, X., 2020. Changing Technologies of RNA Sequencing and Their Applications in Clinical Oncology. *Front. Oncol.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00447>
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57.
- West, A.E., Griffith, E.C., Greenberg, M.E., 2002. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 921–931. <https://doi.org/10.1038/nrn987>
- Wilcox, J.N., 1993. Fundamental principles of in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1725-1733. <https://doi.org/10.1177/41.12.8245419>
- Zygmunt, M., Hoinkis, D., Hajto, J., Piechota, M., Skupień-Rabian, B., Jankowska, U., Kędracka-Krok, S., Rodriguez Parkitna, J., Korostyński, M., 2018. Expression of alternatively spliced variants of the *Dcl1* gene is regulated by psychotropic drugs. *BMC Neurosci.* 19, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0458-4>
- Zygmunt, M., Piechota, M., Rodriguez Parkitna, J., Korostyński, M., 2019. c. Genes, Brain Behav. 18, 1-10. <https://doi.org/10.1111/gbb.12511>
- Zygmunt, M., Piechota, M., Rodriguez Parkitna, J., Korostyński, M., 2016. Decoding the transcriptional programs activated by psychotropic drugs in the brain. *Genes, Brain Behav.* 18, 1–10. <https://doi.org/10.1111/gbb.12511>