

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доцент Нипорко Олексій Юрійович  
Протокол №\_\_ засідання кафедри  
від «\_\_»\_\_\_\_\_ 2023 р.

**ОДНОКЛІТИННА ГЕНОМІКА ТРАВМАТИЧНОЇ ПАМ'ЯТІ:  
ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ДЛЯ ОДНОКЛІТИННОГО  
СЕКВЕНУВАННЯ РНК І ПРОФІЛЮВАННЯ МЕТИЛЮВАННЯ ДНК**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студентки спеціальності  
091 «Біологія»  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Волоско Мирослави Михайлівни**

Науковий керівник від кафедри  
Професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
проф. Солдаткін Олексій Петрович

Робота виконана в лабораторії нейроепігенетики  
Федеральної Політехнічної Школи Лозанни  
під керівництвом проф. **Gräff J.**, та к.б.н. **Батюка М.Ю.**

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2023 р.

## АНОТАЦІЯ

Волоско М.М. Одноклітинна геноміка травматичної пам'яті: оптимізація методів для одноклітинного секвенування РНК і профілювання метилювання ДНК. — Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Метою роботи є дослідження молекулярних та епігенетичних механізмів, що лежать в основі формування травматичної пам'яті та їх змін у часі. Для досягнення цієї мети, застосовуються передові методи, такі як секвенування одноклітинної РНК (scRNA-seq) і профілювання метилювання одноклітинної ДНК (snmC-seq2), на генетично модифікованих мишах лінії TRAP2-Sun1-sfGFP, що використовуються як модель для дослідження травматичної пам'яті.

Були розроблені оптимальні протоколи для використання одноклітинної геноміки та її інтеграції в дослідження травматичної пам'яті, а також валідовані багатоетапні процеси підготовки зразків префронтальної кори мозку для проведення одноклітинного секвенування. Отримані результати надають можливість проведення повномасштабного секвенування та аналізу молекулярних та епігенетичних механізмів утворення та зберігання травматичної пам'яті.

Ключові слова: травматична пам'ять, епігенетика, одноклітинна геноміка, TRAP2, scRNA-seq, snmC-seq2.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ I ПОТОЧНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ .....	8
1.1 ФОРМУВАННЯ ТРАВМАТИЧНОЇ ПАМ'ЯТІ.....	8
1.2. МІСЦЕ ЗБЕРІГАННЯ ТРАВМАТИЧНОЇ ПАМ'ЯТІ.....	8
1.3 МОЛЕКУЛЯРНІ ТА КЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ УТВОРЕННЯ ПАМ'ЯТІ.....	10
1.3.1 Теорія енграм пам'яті та методи «захоплення» енграм.....	10
1.3.2 Роль синаптичної пластичності в зберіганні пам'яті.....	12
1.3.3 Епігенетичні фактори формування пам'яті .....	13
1.4 МЕТОДИ ОДНОКЛІТИННОЇ ГЕНОМІКИ В ДОСЛІДЖЕННІ ПАМ'ЯТІ.....	15
1.4.1 Секвенування РНК однієї клітини ( <i>scRNA-seq</i> ).....	15
1.4.2 Одноклітинне профілювання метилювання ДНК ( <i>sntC-seq2</i> ).....	16
1.4.3 Застосування <i>scRNA-seq</i> і <i>sntC-seq2</i> у подальших дослідженнях...	18
РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ .....	20
2.1 ПОВЕДІНКОВІ ЕКСПЕРИМЕНТИ.....	20
2.1.1 Трансгенні лінії мишей <i>TRAP2-Sun1-sfGFP</i> .....	20
2.1.2 Підготовка ін'єкції.....	20
2.1.3 Поведінкові парадигми.....	21
2.1.4 Розтин мозку .....	21
2.2 ГІСТОЛОГІЯ, МІКРОСКОПІЯ ТА ПІДРАХУНОК КЛІТИН.....	22
2.2.1 Гістологія та підготовка зразків.....	22
2.2.2 Мікроскопія зразків.....	22
2.2.3 Ізоляція ядер.....	23
2.3 <i>scRNA-SEQ</i> .....	24
2.3.1 Перевірка якості РНК .....	24
2.3.2 Фіксація ядер .....	24
2.3.3 Підготовка бібліотек для <i>scRNA-seq</i> .....	24
2.3.4 Секвенування.....	25
2.4 <i>SNMC-SEQ2</i> .....	25
2.4.1 Флуоресцентно-активоване сортування ядер( <i>FANS</i> ).....	25
2.4.2 Бісульфитна конверсія .....	26
2.4.3 Підготовка бібліотек <i>sntC-seq2</i> .....	27
2.5 АНАЛІЗ ТА СТАТИСТИКА.....	28
2.5.1 Аналіз даних .....	28
2.5.2 Аналіз <i>sc-RNA-seq</i> .....	28
РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ .....	29

	4
3.1 ВАЛДАЦЯ ЛІНІЇ МИШЕЙ TRAP2-SUN1-SFGFP .....	29
3.2 ВИДІЛЕННЯ ЯДЕР .....	31
3.3 ПЕРЕВІРКА ЯКОСТІ РНК.....	33
3.4 ФІКСАЦІЙНІ ЕТАПИ .....	34
3.5 ПРОБИГИ scRNA-SEQ НА ВИПРОБУВАЛЬНИХ ЗРАЗКАХ.....	36
3.6 ПІДГОТОВКА БІБЛОТЕК snmC-seq2 .....	38
РОЗДІЛ IV ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	43

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- scRNA-seq - секвенування РНК з однієї клітини (single-cell RNA sequencing)
- snmC-seq2 - секвенування метилювання цитозину в одному ядрі (single nuclei methylation cytosine sequencing)
- PFC - префронтальна кора (prefrontal cortex)
- IHC - імуногістохімія (immunohistochemistry)
- GFP - зелений флуорисцентний білок (green fluorescent protein)
- FANS - сортування активованих флуоресценцією ядер (fluorescence activated nuclei sorting)
- TRAP2 - цілеспрямована рекомбінація в активних популяціях (Targeted Recombination in Active Population)
- 4-OHT - 4-гідрокситамоксифен
- RIN - Показник цілісності РНК (RNA Integrity Number)

## ВСТУП

Пам'ять про страх є невід'ємним елементом виживання людей і тварин, що дозволяє організмам вчитися на загрозовому досвіді та адаптувати свою поведінку. Однак, порушення регуляції цього процесу може призвести до серйозних психічних розладів, включаючи посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) і тривожні розлади. Тому розуміння нейронних механізмів, що лежать в основі формування та консолідації пам'яті про страх, є надзвичайно важливим для розкриття патофізіології цих розладів і розробки ефективних терапевтичних втручань.

Останні роки принесли революційні досягнення в галузі одноклітинної геноміки, що дозволило нам досліджувати складні біологічні процеси з високою роздільною здатністю. Традиційні методи масового секвенування РНК надають усереднені профілі експресії генів з багатьох клітин одночасно, що може приховувати важливу інформацію про клітинну гетерогенність та динаміку змін в клітинних популяціях під час патології. Відтак, використання секвенування одноклітинної РНК дозволяє нам аналізувати моделі експресії генів на рівні окремих клітин, що забезпечує детальне розуміння клітинної різноманітності та основ патології при аналізі змін окремих підтипів клітин. Крім того, профілювання метилювання ДНК на рівні окремих клітин дозволяє вивчати епігеномну гетерогенність у тканинах та основу патологічних змін чи процесів клітинної пам'яті, пов'язаних з цією епігенетичною модифікацією.

Таким чином, основною **метою** цієї дипломної роботи є дослідження молекулярних та епігенетичних механізмів, що впливають на формування травматичної пам'яті, за допомогою методів одноклітинної геноміки. Шляхом поєднання поведінкових експериментів та аналізу scRNA-seq та snmC-seq2, ми маємо надію розкрити динамічні моделі експресії генів та клітинну гетерогенність у префронтальній корі мозку, а також з'ясувати їх мінливість протягом різних проміжків зберігання пам'яті.

**Завданнями** даної роботи є:

1. Проведення поведінкових експериментів виникнення страху на основі мишачої моделі з використанням трансгенної лінії TRAP2-Sun1-sfGFP.
2. Підтвердження експресії зеленого флуоресцентного білку (GFP) у префронтальній корі шляхом застосування імуногістохімічних методів та оптимізація умов індукції GFP у зразках для підтвердження можливості виділення клітин пам'яті.
3. Оптимізація процесу виділення і фіксування ядер та підготовки зразків для проведення scRNA-seq та snmC-seq2.
4. Валідація якості РНК виділених ядер.
5. Проведення пробного секвенування scRNA-seq для оцінки його ефективності.
6. Перевірка протоколу підготовки бібліотек snmC-seq2.

**Новизна** цього дослідження полягає в поєднанні scRNA-seq і snmC-seq для вивчення травматичної пам'яті. Співставлення результатів експресії генів і профілювання метилювання ДНК на рівні однієї клітини надасть нам комплексний огляд молекулярних подій, що відбуваються під час формування травматичної пам'яті з плином часу. Це дозволить нам краще розуміти молекулярні механізми, які лежать в основі цього процесу і можуть вказувати на нові мішені для розвитку терапевтичних підходів у сфері травматичних розладів зумовлених стресом.

## РОЗДІЛ І ПОТОЧНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ

### 1.1 Формування травматичної пам'яті

Травматична пам'ять є типом пам'яті, яка формується внаслідок негативного травматичного досвіду та пов'язана зі страхом. Вона включає у себе умовні рефлекси та асоціації, що виникають між реакціями, спричиненими травмою, та негативними емоціями, що супроводжують ці реакції [1]. Травматична пам'ять може виникати після різних типів стресових подій, таких як травми, насильство, війна чи інші небезпечні ситуації. Під час цих подій мозок використовує механізми запам'ятовування страху для створення асоціацій між небезпекою та конкретними подразниками або контекстом, пов'язаним з травмою. Це допомагає організму розпізнавати потенційні загрози та реагувати на них у майбутньому [2].

Однак травматична пам'ять також може призводити до надмірного узагальнення страху, коли особа реагує на подібні, але безпечні подразники з таким самим рівнем тривожності, як на початкову травматичну подію. Цей процес відомий як перенесення страху і може бути особливо вираженим у людей з посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) чи тривожними розладами. Такі фактори як внутрішній стан організму, генетична спадковість, попередні досвіди, тип і інтенсивність травматичного стимулювання, стрес у ранньому віці та інші, модулюють травматичну пам'ять та процеси узагальнення страху [3].

### 1.2. Місце зберігання травматичної пам'яті

Страх не створюється жодною окремою областю мозку, а скоріше є результатом поєднання різних структур мозку, які забезпечують координацію поведінкових, фізіологічних і суб'єктивних відповідей організму. Формування та консолідація пам'яті страху включає кілька областей мозку, включаючи префронтальну кору (PFC - prefrontal cortex), гіпокамп і мигдалеподібне тіло [4]. Ці регіони взаємодіють і залучені у різних аспектах обробки страху.

Під час обумовлення страху мигдалеподібне тіло відіграє вирішальну роль у зв'язуванні нейтрального подразника з реакцією страху. Воно отримує сенсорну інформацію з навколишнього середовища та формує емоційну пам'ять, зміцнюючи зв'язки між нейронами [5]. Гіпокамп бере участь у кодуванні та первинному зберіганні пам'яті про страх. Він обробляє контекстну інформацію та забезпечує часову та просторову основу для пам'яті страху [6]. Префронтальна кора головного мозку, зокрема області, відомі як прелімбічна кора (PL) і інфралімбічна кора (IL), також відіграють важливу роль у обробці страху. Вважається, що у гризунів PL регулює вираження страху, тоді як IL опосередковує придушення страху. PL активна під час отримання та кодування спогадів про страх. Вона отримує вхідні дані від мигдалини та гіпокампу, об'єднуючи емоційну та контекстуальну інформацію. Групи нейронів у PL активуються під час навчання страху та сприяють консолідації оригінальної пам'яті про страх [7] [8].

Зв'язок між гіпокампом, мигдалеподібним тілом і PFC має вирішальне значення для формування та консолідації пам'яті страху. Гіпокамп надає мигдалеподібному тілу контекстну інформацію, дозволяючи зв'язати пам'ять про страх із певними сигналами навколишнього середовища. Мигдалеподібне тіло, у свою чергу, взаємодіє з PFC, включаючи PL і IL кори головного мозку, щоб модулювати вираження та придушення страху [8].

У людини гомологами PL та IL кори головного мозку гризунів є дорсолатеральна префронтальна кора (DLPFC) та вентромедіальна префронтальна кора (VMPFC) відповідно. DLPFC бере участь у регуляції страху та процесах когнітивного контролю, тоді як VMPFC відіграє роль у регуляції емоцій та зникненні пам'яті. Ці префронтальні області людини демонструють функціональні та анатомічні зв'язки з мигдалиною та гіпокампом, подібно до їхніх аналогів у гризунів [9].

## 1.3 Молекулярні та клітинні механізми утворення пам'яті

### 1.3.1 Теорія енграм пам'яті та методи «захоплення» енграм

Пам'ять включає чотири різні характеристики: кодування, консолідацію, зберігання та пригадування. Кодування — це процес, за допомогою якого інформація, що досягає мозку через сприйняття, записується в нього. Консолідація дозволяє відібрати інформацію та зробити її стабільною протягом тривалого часу. Стабільне зберігання пам'яті передбачає постійні модифікації для збереження інформації, а пригадування – це процес, який дозволяє повторно активувати відповідну інформацію за конкретними та точними сигналами, щоб дозволити модифікувати поведінку [10].

У 1904 році Річард Семон запропонував ідею «енграми» та визначив її як «постійну, хоча й первинну приховану модифікацію в збудливій субстанції, спричинену стимулом» [11]. Енграма, яку іноді розуміють як синонім сліду пам'яті, утворена групою нейронів, які активуються під час запам'ятовування певного досвіду, модифікуються цим досвідом і повторно активуються шляхом впливу такої ж події, викликаючи зміну поведінки тварини [12].

Відповідно до теорії енграм пам'яті [12][13][14], отримання спогадів і зберігання пам'яті є активним нейробіологічним процесом, під час якого невелика популяція нейронів (ансамбль або енграма) активується і зазнає постійних фізичних і хімічних змін (рисунок 1.1). Згодом, коли стимул повертається, ці нейрони повторно реактивуються, щоб викликати спогади про певні події [12].

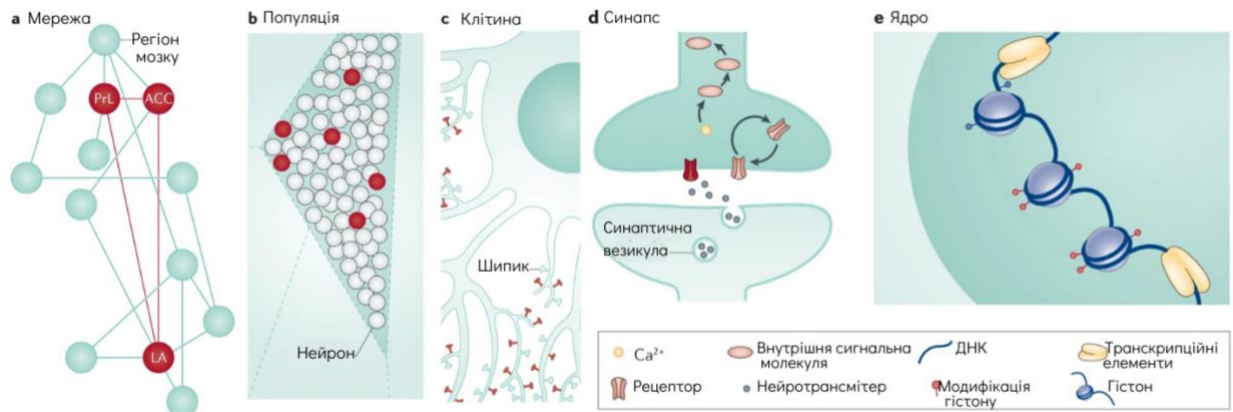


Рисунок 1.1 (модифіковано з [14]). Схема зображення енграм (позначено червоним кольором) на різних рівнях організації. а) На рівні мозкової мережі до енграми може бути залучено декілька ділянок мозку. б) На рівні нейронної популяції до енграм можуть бути залучені підгрупи нейронів у межах області мозку. в) При формуванні кожної енграми відбуваються зміни на рівні окремих нейронів. д) Зміни можуть відбуватися в групах синапсів (наприклад, процес синаптичного посилення - LTP). е) На ядерному рівні енграма може відображатися в транскрипційних та епігенетичних змінах. ACC, передня поясна кора; LA, латеральна мигдалина; PrL, прелімбічна кора.

Різні типи пам'яті можуть підтримуватися енграмами у відповідних областях мозку. Енграма не є статичною структурою, після кодування процеси консолідації можуть змінити фізичну та хімічну організацію енграм, що впливає на її стійкість, силу та якість. Хоча консолідація пам'яті передбачає процес фіксації або стабілізації пам'яті про досвід, енграми можуть бути динамічними [16]. Незважаючи на це, динамічність не перешкоджає здатності та успіху в знаходженні енграми в будь-який момент часу.

Для отримання генетичного доступу до нейронних ансамблів або енграми доступні різні стратегії та тваринні моделі [14]. TRAP2 (Targeted Recombination in Active Population-цілеспрямована рекомбінація в активних популяціях) забезпечує генетичний доступ до активних нейронів в межах точного часового проміжку, використовуючи промотор Fos (негайний ранній ген, підвищена експресія якого зазвичай використовується як індикатор активації нейронів [15]) для стимулювання експресії рекомбінази CreERT2 лише тоді, коли 4-гідрокситамоксифен (4-ОНТ) системно вводять у час

досліді (рис 1.2) [17]. Технологію TRAP2 можна застосовувати за допомогою трансгенних мишей TRAP2.

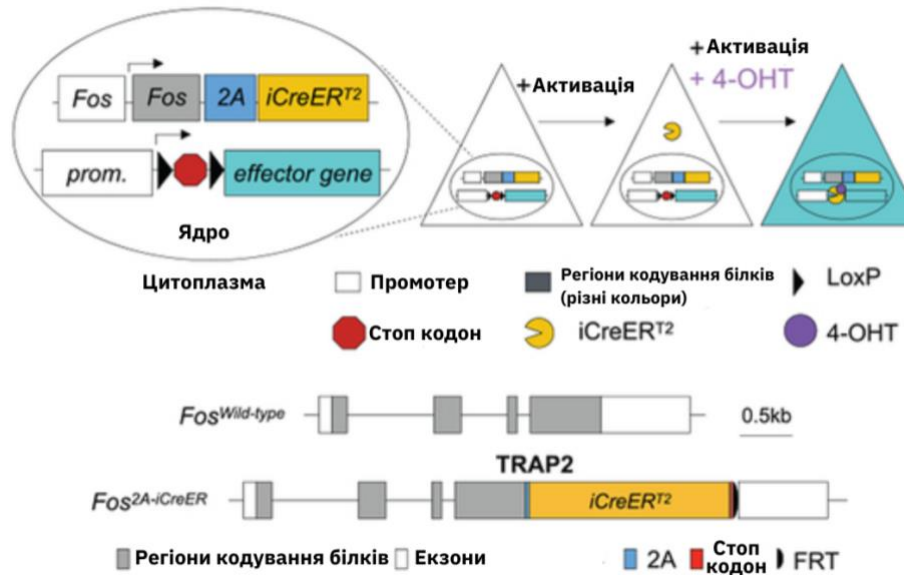


Рисунок 1.2 (модифіковано з [17]). TRAP2 забезпечує генетичний доступ до активних нейронів з точним часовим контролем. Цей процес базується на використанні промотора Fos для стимулювання експресії рекомбінази CreERT2 лише під час системного введення 4-гідрокситамоксифену під час експерименту.

TRAP2 забезпечує постійний генетичний доступ до нейронів, активованих певним досвідом [17]. Система TRAP2 використовує негайний ранній локус гена для керування експресією тамоксифен-індукованого CreER разом із трансгенним або вірусно доставленим Cre-залежним ефектором (рис 1.2). Коли нейрон активний у присутності тамоксифену, CreER може увійти в ядро, щоб каталізувати рекомбінацію, що призводить до постійної експресії ефектора.

### 1.3.2 Роль синаптичної пластичності в зберіганні пам'яті

Молекулярні та клітинні зміни, що відбуваються під час утворення пам'яті, включають синаптичну пластичність: зміни в силі синапсів, збуджуваності нейронів, активності нейронних ансамблів та молекулярну переорганізацію синапсів [18].

Синаптична пластичність відіграє ключову роль у формуванні пам'яті. Геббіанська та гомеостатична пластичності відповідають за зміни в силах синапсів та збуджуваності нейронів під час кодування та збереження інформації [19]. Синаптична потенціація (LTP) або депресія (LTD) можуть відбуватися через молекулярні механізми, такі як полімеризація актину та включення або вилучення AMPA-рецепторів з постсинаптичної мембрани. Ці пластичні зміни вимагають білкового синтезу та експресії генів. Негайні відповідні гени, такі як *arc*, *homer1a*, *c-fos* або *egr1/zif-268*, відіграють важливу роль у формуванні та збереженні пам'яті. Експресія цих генів впливає на синаптичну структуру та функцію, сприяючи змінам в силі синапсів та нейронній зв'язності [20].

мРНК білків, які пов'язані з пластичністю, можуть транлюватися як в сомі, так і локально в дендритах та синапсах. Знаходження мРНК або білків, пов'язаних з пластичністю, в дендритній периферії та стимульованих синапсах здійснюється за допомогою короточасних молекулярних міток, таких як фосфорилування САМКПа, РКА або САМКПб. Такі білки, пов'язані з пластичністю, можуть виконувати роль ефекторів, що підтримують пластичність безпосередньо в синаптичних шипах, або ініціювати активацію генів вторинної відповіді, включаючи транскрипційні фактори, транскрипцію та білковий синтез [21].

### 1.3.3 Епігенетичні фактори формування пам'яті

Молекулярні процеси, що лежать в основі формування пам'яті про страх, охоплюють не лише традиційні транскрипційні і протеомні механізми, але й епігенетичні модифікації. Епігенетика визначається як група процесів регуляції експресії генів вище рівня первинної послідовності нуклеотидів у геномі, і включає в себе хімічне «маркування» ДНК або пов'язаних з нею білків – гістонів. Епігенетичні механізми регуляції експресії генів дозволяють генотипово ідентичним клітинам бути фенотипово різними. Епігенетичне маркування геному може мати кілька форм. Метилування ДНК та

ацетилювання, фосфорилування, убіквітилування та метилювання гістонів обговорюються як потенційні механізми для епігенетичного мічення геному [22]. Епігенетичні механізми також включають трьохвимірну укладку ДНК у ядрі, чи регуляцію експресії за допомогою малих РНК.

Нещодавнє дослідження показало, що ті самі процеси, які призводять до формування довгострокової пам'яті, також призводять до епігенетичного маркування геному. Ацетилювання гістону H3 значно посилюється після того, як у тварини індукується контекстуальний страх. Формування довготривалих контекстних спогадів страху вимагає синаптичної передачі, залежної від NMDA (N-метил-D-аспартат)-рецептора, і сигнального каскаду MEK-ERK/MAPK (де MEK відноситься до MAPK/ERK-кінази) у гіпокампі. Інгібування будь-якого з цих процесів блокує збільшення ацетилювання H3. Ці спостереження були першими, які показали, що епігенетичне мічення генома відбувається під час консолідації довготривалих спогадів. Цікаво, що інша форма довготривалої пам'яті (латентне гальмування) була пов'язана зі зміненим ацетилюванням H4, але не H3. Це відкриття вказує на те, що може існувати гістоновий код для формування пам'яті, за допомогою якого конкретні типи пам'яті пов'язані зі специфічними моделями модифікації гістонів [23].

Метилювання ДНК – головний механізм репресії транскрипції, що базується на ковалентному додаванні метильних груп до цитозинових основ у ділянках ДНК багатих на CG, які називаються CpG-острівцями. За допомогою аналізу метилювання CpG-острівців в корі головного мозку було показано що метилювання ДНК у промоторній області кальциневрину та ріліну залучене до формування довготривалої травматичної пам'яті. Цікавим є те, що на відміну від довготривалих змін метилювання ДНК в корі, гіпокамп характеризувався лише тимчасовими змінами в наступні дні після формування травматичної пам'яті [22].

Головним недоліком багатьох досліджень є те, що епігенетичні модифікації продовжують досліджуватися на гомогенному рівні цілої тканини

[24]. В гетерогенних тканинах, таких як мозок, дослідження змін в окремих популяціях клітин, що відіграють роль при формуванні пам'яті, було довгий час недосяжним завданням. У подальших дослідженнях слід звернути увагу на аналіз епігенетичних модифікацій на рівні окремих клітин та їх взаємозв'язок з молекулярними та функціональними властивостями. Це відкриває нові можливості для розуміння ролі епігенетичних модифікацій у формуванні пам'яті та розвитку психічних розладів.

## **1.4 Методи одноклітинної геноміки в дослідженні пам'яті.**

### **1.4.1 Секвенування РНК однієї клітини (scRNA-seq)**

Аналіз одноклітинної РНК (scRNA-seq) надає можливість вивчення та розуміння молекулярних механізмів, що визначають характеристики клітин в нервовій системі [25]. Традиційно клітини класифікувались за допомогою масового секвенування РНК, яке забезпечило базову систему класифікації основних типів клітин і важливу основу для вивчення клітинного ландшафту в ЦНС [26]. Однак, за допомогою scRNA-seq можна виявити динамічні зміни в експресії генів на рівні окремих клітин. Це дозволяє отримати важливі уявлення про поточні клітинні реакції та механізми, що відбуваються під час фізіологічних та патологічних процесів [27].

Однією з основних переваг scRNA-seq є його здатність до створення молекулярного атласу мозку з неперевершеною роздільною здатністю. Це дозволяє розширити наше розуміння структурної організації мозку та виявити схеми зв'язку та функціональної інтеграції областей мозку, які нас цікавлять [28]. За допомогою scRNA-seq можна виявити різні клітинні субпопуляції та лінії в мозку, що полегшує розробку нових інструментів з точним спрямуванням на конкретні клітини та області мозку.

Другою важливою перевагою є детальне молекулярне профілювання для вивчення вразливості конкретних клітинних субпопуляцій під час патологічних процесів. Цей метод дозволяє виявити зміни в експресії генів у

різних клітинах і встановити, які саме популяції клітин є основними мішенями [29].

Третя перевага полягає у застосуванні лікарських засобів і спостереженні за реакцією різних клітинних популяцій на ці засоби. Завдяки scRNA-seq можна виявити зміни в експресії генів після фармакологічного втручання і визначити, які популяції клітин специфічно реагують на лікарські засоби [29].

Загалом, scRNA-seq надає значний внесок у нейронаукові дослідження, допомагаючи створити детальний молекулярний атлас мозку, вивчати молекулярну вразливість клітинних субпопуляцій та ідентифікувати нові лікарські цілі для лікування неврологічних захворювань [27].

10x Genomics scRNA-seq є широко популярною технікою секвенування одноклітинної РНК. Він використовує краплинний підхід для захоплення та штрих-кодування окремих клітин, що забезпечує високопродуктивний аналіз експресії генів на рівні однієї клітини. Однак у нашому дослідженні, ми використовуємо Parse Biosciences Evercode™ WTV2, який базується на іншій методології. Він передбачає маркування «штрих-кодом» (баркодування) окремих клітин із застосуванням методів комбінаторного баркодингу в чотири етапи на основі зворотної транскрипції та лігації. Це дозволяє унікально ідентифікувати кожну клітину та пов'язані з нею молекули РНК. Після маркування унікальними баркодами, виконується лізис клітин, щоб вивільнити ядерний вміст, і формуються бібліотеки для подальшого секвенування.

#### **1.4.2 Одноклітинне профілювання метилювання ДНК (snmC-seq2).**

Метилювання ДНК – це епігенетична модифікація, яка відіграє важливу роль у регуляції генів та клітинних процесів. Рівні метилювання ДНК можуть варіювати між різними типами клітин, тканинами та стадіями розвитку, а некоректне метилювання ДНК пов'язують з різними захворюваннями, включаючи неврологічні розлади [30]

Дослідження метилювання ДНК на рівні однієї клітини відкриває можливості для вивчення епігенетичних змін та регуляції генів. В людей метилювання спостерігають на цитозинових залишках [31]. Метилювання ДНК відбувається за участю ферментів, відомих як ДНК-метилтрансферази (DNMTs). Вони передають метильну групу від S-аденозилметіоніну (SAM) на п'ятий вуглець цитозинового залишку, утворюючи 5-метилцитозин (5mC або mC). Метилювання геному хребетних тварин відбувається на CG динуклеотидах, які називаються CpG [32].

Виявлення метилювання ДНК часто означає підтвердження метилювання цитозину CpG в геномі. У людини в геномі присутні 28 мільйонів CpG динуклеотидів, і відомо, що 60-80% з них метильовані [34]. Регіони, де CpG розподіляються з високою щільністю, і вони задовольняють вимоги до щільності та масштабу, називаються островами CpG (CGI). Біля островів CpG розташовані більшість генів, і існує висока кореляція між розташуванням островів CpG і промоторами генів [35]. Метилювання на одиночних CpG сайтах спостерігається лише в мозку та стовбурових клітинах [33].

Загалом, метилювання CpG сайту часто спричинює пригнічення транскрипції гена [36]. Однак контрприклад також свідчать про те, що метилювання CpG певного сайту або регіону не гарантує пригнічення гена [37].

Точний сенс метилювання CpG для гена можна підтвердити, перевіривши його взаємозв'язок з іншою інформацією, такою як рівні експресії РНК або доступність хроматину. З цієї причини було розроблено багато методів мультиомного аналізу. Метилювання ДНК має перевагу у тому, що воно легко надає можливість перевірки різниці між зразками за різних умов. Шляхом порівняння відносного метилювання між зразками можна визначити конкретні ключові сайти або регіони CpG, відповідальні за відмінності в метилюванні.

На рівні однієї клітини метилювання окремих CpG сайтів чітко поділяється на метильовані та неметилювані, а метилювання різних місць відображає відмінності між різними клітинами. Тому в методології одиночних клітин метилювання ДНК може бути ефективним маркером, що відрізняє окремі клітини за різних умов або різні типи клітин.

Методика snmC-seq2, описана групою Екера [39], є ефективним підходом для профілювання метилювання ДНК на рівні одного ядра. Вона дозволяє отримати високоякісні дані про метилювання ДНК від кожної клітини.

Методика snmC-seq2 починається зі сортування окремих клітин і отримання їхнього ядерного ДНК. Далі, ДНК піддається бісульфитній конвертації, що змінює неметилювані цитозини в урацили. Метилювані і неметилювані цитозини вирізняють після порівняння з нормальною послідовністю геному.

Таким чином, методика snmC-seq2 дозволяє профілювати метилювання ДНК на рівні окремих клітин. Цей підхід відкриває широкі можливості для вивчення епігенетичних механізмів регуляції генів та виявлення клітинних популяцій зі зміненими метиляційними профілями, що можуть бути пов'язані з розвитком захворювань або іншими фізіологічними процесами.

### 1.4.3 Застосування scRNA-seq і snmC-seq2 у подальших дослідженнях

Для подальших досліджень, з використанням методів scRNA-seq і snmC-seq2 у контексті нашого дослідження, ми прагнемо розкрити складний зв'язок між метилюванням ДНК і експресією генів у контексті травматичної пам'яті.

За допомогою методу scRNA-seq, ми плануємо отримати комплексний знімок генів, які активно транскрибуються та експресуються в клітинах та тканинах, пов'язаних з травматичною пам'яттю. Це дозволить нам отримати інформацію про генетичні механізми, що залучені до формування та регуляції травматичної пам'яті.

Однак, для отримання більш глибокого розуміння молекулярних механізмів, що відбуваються у префронтальній корі мозку мишей, ми плануємо поєднати аналіз метилювання ДНК зі секвенуванням РНК на рівні однієї клітини. Це дозволить нам вивчити, як зміни в метилюванні ДНК корелюють зі змінами в експресії генів в конкретних клітинах та тканинах, пов'язаних з травматичною пам'яттю.

Усе це дозволить нам розкрити складний механізм епігенетичних модифікацій, зокрема метилювання ДНК, та його вплив у формуванні травматичної пам'яті.

## РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1 Поведінкові експерименти

#### 2.1.1 Трансгенні лінії мишей TRAP2-Sun1-sfGFP

Тварини TRAP2 були схрещенні з Cre-залежними тваринами Sun1–sfGFP для отримання гетерозиготних тварин для обох алелів. Миші утримувалися в стандартних умовах з контрольованою температурою та циклом 12 годин світла/темряви. На час проведення експерименту миші досягали віку в 3 місяці, були використані лише самці. Для забезпечення неупереджених результатів трансгенні миші були випадково розподілені на різні експериментальні умови в межах однієї клітки. Усі досліди на тваринах були проведені та схвалені кантональними ветеринарними органами Швейцарії (ліцензія 2808x2).

#### 2.1.2 Підготовка ін'єкції

4-гідрокситамоксифен (4-ОНТ, Sigma, H6278) розчиняли в етанолі з концентрацією 20 мг/мл при 37°C протягом 15 хвилин, аліквоти зберігали при –20°C протягом кількох тижнів. Перед використанням, 4-ОНТ повторно розчиняли в етанолі шляхом струшування при 37°C протягом 15 хвилин, додавали суміш 1:4 касторової олії: соняшникової олії (Sigma, Cat #s 259853 і S5007), щоб отримати кінцеву концентрацію 10 мг/мл 4-ОНТ, етанол випаровували у вакуумі при центрифугуванні. Кінцеві розчини ін'єкували в кількості 50 мг/кг (а також інші кількості для проведення порівняльних експериментів, які описані у главі «Валідація лінії мишей TRAP2-Sun1-sfGFP»). Розчини завжди використовували в день їх приготування на протязі кількох годин і зберігались в термостаті за температури 37°C, щоб уникнути осадження.

### 2.1.3 Поведінкові парадигми

Мишей було розподілено на 3 експериментальні групи: сильне зумовлення страху, слабке зумовлення страху та контрольна група.

Умова сильного зумовлення страху була використана для оцінки навчання травматичної пам'яті мишей. За 30 хвилин до процедури мишей перемістили з житлової кімнати в кімнату поведінкових експериментів, щоб вони звикли до навколишнього середовища. Використовуючи мультикондиціонуючу систему TSE, кожну тварину помістили в апарат і запустили парадигму. Парадигма складалася з трихвилинної фази звикання з наступною паузою тривалістю 28 секунд перед тим, як тварина отримала електричний шок силою 0,8 мА протягом двох секунд. Ця стадія паузи-шоку виникала загалом три рази, за якою слідувала 15-секундна пауза. Апарат ретельно очищали 5% EtOH між кожною твариною.

Додатково була використана умова з одним шоком 0.2 мА. Ця група була включена для оцінки помірного страху мишей. Парадигма складалася з фази звикання тривалістю 3 хвилини, після чого наступала пауза тривалістю 28 секунд перед тим, як тварина отримувала один шок силою 0.2 мА протягом 2 секунд.

Останньою групою була контрольна група, яка знаходилась в мультикондиціонуючій системі 3 хвилини без будь-якого шоку. Цей період дозволяв мишам вивчати нове середовище без залучення страху.

Перш ніж тварину повернули до домашньої клітки, їм було проведено ін'єкцію 4-ОНТ. Всі ін'єкції проводили внутрішньоочеревно.

### 2.1.4 Розтин мозку

Після проведення поведінкових експериментів, розтин мозку мишей був виконаний через 28 або 7 днів. Префронтальна кора була акуратно виокремлена на протязі 10-12 хвилин після смерті на чашці Петрі з використанням розчину фосфатного буферу (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl,

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, та 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) під мікроскопом. Для прецизійної ідентифікації регіонів префронтальної кори, мозок порівнювався з атласом мозку миші, зосереджуючись на регіонах PFC. Далі зразки були розділені на ліву та праву півкулі, переміщені до пробірок і замороженні з використанням сухого льоду для зберігання.

## **2.2 Гістологія, мікроскопія та підрахунок клітин.**

### **2.2.1 Гістологія та підготовка зразків.**

Мишам проводили перфузію, а мозок фіксували протягом 24 годин у розчині 4% параформальдегіду перед переведенням у 30% розчин сахарози. Потім готували зрізи мозку 20 мкм (роторний мікротомний кріостат Leica CM1950) і зберігали при 4°C у розчині антифризу (30% етиленгліколю, 15% сахарози, 0,02% азиду натрію). Зрізи промивали три рази в 1X PBS перед тим, як інкубувати в блокуючому розчині (1% BSA і 0,5% Triton-X, розведені в 1X PBS) протягом однієї години при кімнатній температурі. Потім зразки інкубували протягом ночі при 4°C в блокуючому розчині з відповідними первинними антитілами Abcam Goat anti-GFP у співвідношенні 1:1000. Потім зразки промивали один раз у 0,1% розчині Triton-X/1X PBS перед тим, як інкубувати при кімнатній температурі протягом двох годин у 1% BSA, 0,1% розчині Triton-X/1X PBS, що містить вторинні антитіла Donkey anti-Goat Alexa Fluor 488, розведені 1:1000. Потім зразки промивали один раз у PBS та інкубували протягом 5 хвилин у розчині Hoechst (1:5000, Invitrogen, H3570). Зразки промивали ще три рази у фосфатному буферному розчині, переносили на гістологічне скло, висушували перед додаванням Fluoromount-G (Southern Biotech, 0100-01) та приклеювали покривне скельце.

### **2.2.2 Мікроскопія зразків.**

Флуорисцентний мікроскоп Olympus VS120 використовувався для отримання зображень PFC для кожного зрізу мозку. Усі слайди були отримані

за допомогою об'єктиву UPLSAPO 20x/0.75 з роздільною здатністю 0.60 мм. Для детекції DAPI використовувався синій канал, пропускної смуги BP 377/50, з налаштуванням експозиції 50 мс, а для детекції GFP з використанням пропускної смуги HC 485/20, експозиція — 300 мс.

Для подальшої обробки зображень використовувався QuPath версії 0.4.3 для виявлення GFP та DAPI клітин у відповідних областях мозку. Використовувався автоматичний підрахунок клітин за допомогою програмних скриптів.

### 2.2.3 Ізоляція ядер

Зразки розморожувалися на льоду, ресуспендувалися в буфері гомогенізації (1.5 М цукроза (Sigma, S0389-500G, RNase-), 25 mM KCl (Sigma, 60142, RNase-), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (M1028, Sigma, RNase-), 10 mM Тризма HCl pH 7.4 (T2194, Sigma, RNase-), 1 mM ДТТ (Sigma, 43816, RNase-), протеазний інгібітор (cOmplete, EDTA free (Roche, 11873580001)), RiboLock RNКазний інгібітор (1 U/ul (Thermo EO0382)), NP-40 1% (EMD, 492018), та гомогенізувалися за допомогою 1-мл скляного гомогенізатора (Wheaton, 357538). Гомогенати фільтрувалися за допомогою фільтра з розміром пор 40 мкм, центрифугувалися при 1000g протягом 8 хвилин при 4°C і ресуспендувалися у ядерному буфері (1.5 М цукроза, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Тризма HCl pH 7.4, 1 mM ДТТ, протеазний інгібітор, RiboLock RNКазний інгібітор 1 U/ul. Потім створювався розчин ядер з градієнтним буфером, кінцевої концентрації Йодиксанол 29% (Axisshield, 1114542), 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Тризма HCl pH 7.4, протеазний інгібітор, RiboLock RNКазний інгібітор 40 U/мкл, 1 mM ДТТ). Центрифугування проводилося при 10000g протягом 20 хвилин. Якість і кількість ядер оцінювалися за допомогою автоматизованого лічильника клітин (Countess II, Thermo Fisher).

## 2.3 scRNA-seq

### 2.3.1 Перевірка якості РНК

З ізольованих ядер виділялась РНК за допомогою RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74007). Якість РНК визначалась за допомогою автоматичної електрофорезної системи TapeStation 4200 (Agilent) з реагентами High Sensitivity RNA ScreenTape Ladder (Agilent, 5067-5581) та High Sensitivity RNA ScreenTape Sample Buffer (Agilent, 5067-5580).

### 2.3.2 Фіксація ядер

Фіксацію ядер виконано за допомогою набору Evercode™ Nuclei Fixation v2 (Parse Bioscience, ECF2003). Інгібітор РНКаз був доданий безпосередньо до пробірки з ядерним буфером. Підготовлено Nuclei Buffer + BSA (Fraction V (2905-5GM, Sigma)), який зберігався на льоду. Ядра ресуспендувались в BSA-блоковані пробірки, і була підрахована їх кількість. Далі, ядра були осаджені в центрифугі при різних швидкостях і ресуспендовані в Nuclei Buffer + BSA. Провели процедуру фільтрації та перенесли ядра до нової пробірки. До пробірки додали розчин для фіксації ядер, інкубували і додали розчин для проникності ядерної мембрани. Буфер для нейтралізації ядер був доданий, після чого ядра осаджувалися та ресуспендувалися в буфері для ядер. Повторно здійснили фільтрацію, та перенесли ядра до іншої пробірки. Додавали ДМСО поступово, обережно перемішуючи. Кількість ядер була знову підрахована, а зафіксовані ядра зберігалися при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для блокування пробірок використовувався 1% розчин BSA, в якому пробірки інкубували 30 хвилин, а потім висушували до повного висихання.

### 2.3.3 Підготовка бібліотек для scRNA-seq

scRNA-seq був виконаний технологією Parse Bioscience Evercode™ WTV2 (ECW02030). Проводилось баркодування одиночних клітин за допомогою зворотньо-транскрипційного та лігаційного баркодингу, лізису

клітин та формування суббібліотек. Ампліфікація кДНК включала: підготовку зв'язувальних частинок (binder beads), застосування binder beads до лізатів підбібліотек, ампліфікацію кДНК та очищення після ампліфікації за допомогою SPRI-частинок. Підготовка бібліотек для секвенування включала такі кроки: фрагментацію, репарацію кінців та додавання "А-хвостів" до фрагментів, вибір фрагментів за допомогою SPRI, лігацію адаптерів, очищення після лігації за допомогою SPRI, ПЛР підбібліотек та вибір фрагментів для післяампліфікаційного очищення. Концентрацію бібліотек визначали за допомогою набору Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Q32853). Розмір фрагментів ДНК визначали за допомогою автоматичної електрофорезної системи TapeStation 4200 (Agilent) з реагентами High Sensitivity D5000 Reagents (Agilent, 5067-5593).

#### **2.3.4 Секвенування**

Секвенування було виконано департаментом Політехнічної федеральної школи Лозанни— Gene Expression Core Facility. Пул бібліотек секвенували за допомогою 160 циклів High Output Kit v2.5 (Illumina, 20024907) на Illumina NextSeq 500. Бібліотеки секвенували за допомогою 74 циклів для читання фрагменту 1, 6 циклів для індексу і7 і 86 циклів для читання фрагменту 2. У середньому було 51579 читань і ідентифіковано 4138 генів на ядро.

## **2.4 snmC-seq2**

### **2.4.1 Флуоресцентно-активоване сортування ядер(FANS)**

FANS використовується для відокремлення і виділення окремих ядер клітин зі зразків на основі їх флуоресцентних властивостей. У нашому дослідженні ми використовували сортер Sony SH800 з опцією "Purity mode" та соплом діаметром 100 мікрометрів для сортування.

Процес сортування відбувався в два етапи. Спочатку, ми визначали популяцію ядер без пошкоджень. Це була основна популяція, яку ми бажали виділити для подальших досліджень. Далі, ми аналізували наявність GFP енграм, яка є характерною для популяцій ядер, що знаходяться віддалено від загальних ядер. GFP може бути збуджений лазерною хвилею 488 нм і оптимально реєструється при 510 нм.

Після сортування ядер відбувалась подальша обробка даних з використанням програмного забезпечення Sony, що забезпечувало аналіз меж сортування та дозволяло розділяти популяції ядер для подальших експериментів.

#### 2.4.2 Бісульфитна конверсія

Одиночні ядра були посортовані в 384-луночні плашки PCR з 2 мкл буферу для лізису в кожній лунці. Об'єм 20 мкл буферу для лізису містив 10 мкл M-digestion buffer (2×, Zymo B 5021-9), 1 мкл протеази К (20 мг, Zymo D3001-2-20), 9 мкл води та 10 мкл lambda DNA (100 pg/μL, Promega, D1521). Плашки інкубували при температурі 50°C 30 хвилин після сортування.

До кожної лунки 384 плашки додавалося 15 мкл реагенту для СТ конверсії (Zymo D5003-1). Плашки інкубували при 98 °C протягом 8 хвилин, потім при 64 °C протягом 3,5 години, а після цього зберігали при 4 °C. Усі наступні кроки центрифугування проводилися протягом 5 хвилин при 5000 g. До Zymo-Spin 384 Well Plate (Zymo C2012) додавалося 80 мкл буферу для зв'язування М (Zymo D5006-3), а бісульфит-конвертовані зразки переносилися до цих плашок та перемішувалися, після чого проводилось центрифугування. До плашки додавалося 100 мкл буферу для промивання М (Zymo D5040-4), і плашки центрифугувалися. Далі додавалося 50 мкл буферу для десульфонації М (Zymo D5040-5), і плашки інкубувалися при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, після чого проводилося центрифугування. Плашки промивалися двічі з використанням 100 мкл буферу для промивання М, потім

елюювалися в чисту 384-луночну плашку з 7 мкл буферу EB (Qiagen 19086), що містить 500 нМ праймерів RP-N або RP-H.

### 2.4.3 Підготовка бібліотек snmC-seq2

Бісульфіт-конвертовані зразки денатурувалися при 95 °C протягом 3 хвилин, потім розміщувалися на льоду протягом 2 хвилин. До кожної лунки додавали 5 мкл суміші Master mix [1  $\mu$ L 10 $\times$  Blue Buffer (Enzymatics B0110), 0.25  $\mu$ L Klenow Exo- (50U/ $\mu$ L, Enzymatics, P7010-NC-L), 0.5  $\mu$ L dNTP (10 mM each, NEB N0447L), 3.25  $\mu$ L води] і інкубували при 4 °C протягом 5 хвилин, при 25 °C протягом 5 хвилин і при 37 °C протягом 60 хвилин, а потім зберігали при 4 °C. До плашки додавали 1,5 мкл суміші ферментів, що містить 1 мкл Exonuclease 1 (20 U/ $\mu$ L, Enzymatics X8010L) та 0,5 мкл rSAP (1 U/ $\mu$ L, NEB M0371L), після чого інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин, а потім зберігали при 4 °C. До суміші додавали 0,8 $\times$  SPRI-частинки, перемішували і інкубували протягом 5 хвилин при кімнатній температурі, щоб ДНК зв'язалася. Суспензія промивалася тричі з використанням 80% етанолу, а потім проходила елюцію в 10 мкл буферу EB (Qiagen 19086). Зразки денатурувалися знову при 95 °C протягом 3 хвилин, і до них додавали 10,5 мкл Adaptase master mix [2 мкл G1, 2 мкл G2, 1,25 мкл G3, 0,5 мкл G4 та 0,5 мкл G5 (Swift Biosciences 33096)], інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин, а потім при 95 °C протягом 2 хвилин. До реакції ПЛР додавали 25 мкл 2 $\times$  КАРА HiFi HotStart ReadyMix (Кара, KK2602) і 5 мкл indexing primer mix (6 мкМ P5 і 10 мкМ P7). Програма ПЦР була наступною: (1) 95 °C протягом 2 хвилин; (2) 98 °C протягом 30 с; (3) 98 °C протягом 15 с; (4) 64 °C протягом 30 с; (5) 72 °C протягом 2 хвилин; (6) 72 °C протягом 5 хвилин; і (7) утримування при 4 °C. Повторити кроки 3-5 протягом 15 циклів. Реакції ПЛР очищалися з використанням 0,8 $\times$  SPRI-частинок протягом трьох циклів. Концентрацію бібліотек визначали за допомогою набору Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Q32853).

## **2.5 Аналіз та статистика.**

### **2.5.1 Аналіз даних**

Статистичний аналіз та побудова графіків були зроблені за допомогою програмної мови Python.

### **2.5.2 Аналіз sc-RNA-seq**

Демультіплексія, мапування фрагментів відносно геному та підрахунок фрагментів на конкретні гени проводились за допомогою Parse Biosciences split-pipeline. Вторинний аналіз проводився на мові програмування R за допомогою пакунка Seurat.

## РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ

### 3.1 Валідація лінії мишей TRAP2-Sun1-sfGFP

Для підтвердження тамоксифен-індукованої експресії GFP, з концентрацією ін'єкції 4-гідрокситамоксифену(4-ОНТ), розведеному в олії, 50мг/кг, був проведений імуногістологічний (ІНС) аналіз тканин мозку мишей з подальшим обрахунком. Енграмні клітини було підраховано як кількість GFP-позитивних клітин поділену на загальну кількість ядер, пофарбованих DAPI. Ми змогли чітко розрізнити енграми на мікроскопічних знімках(рис 3.1).

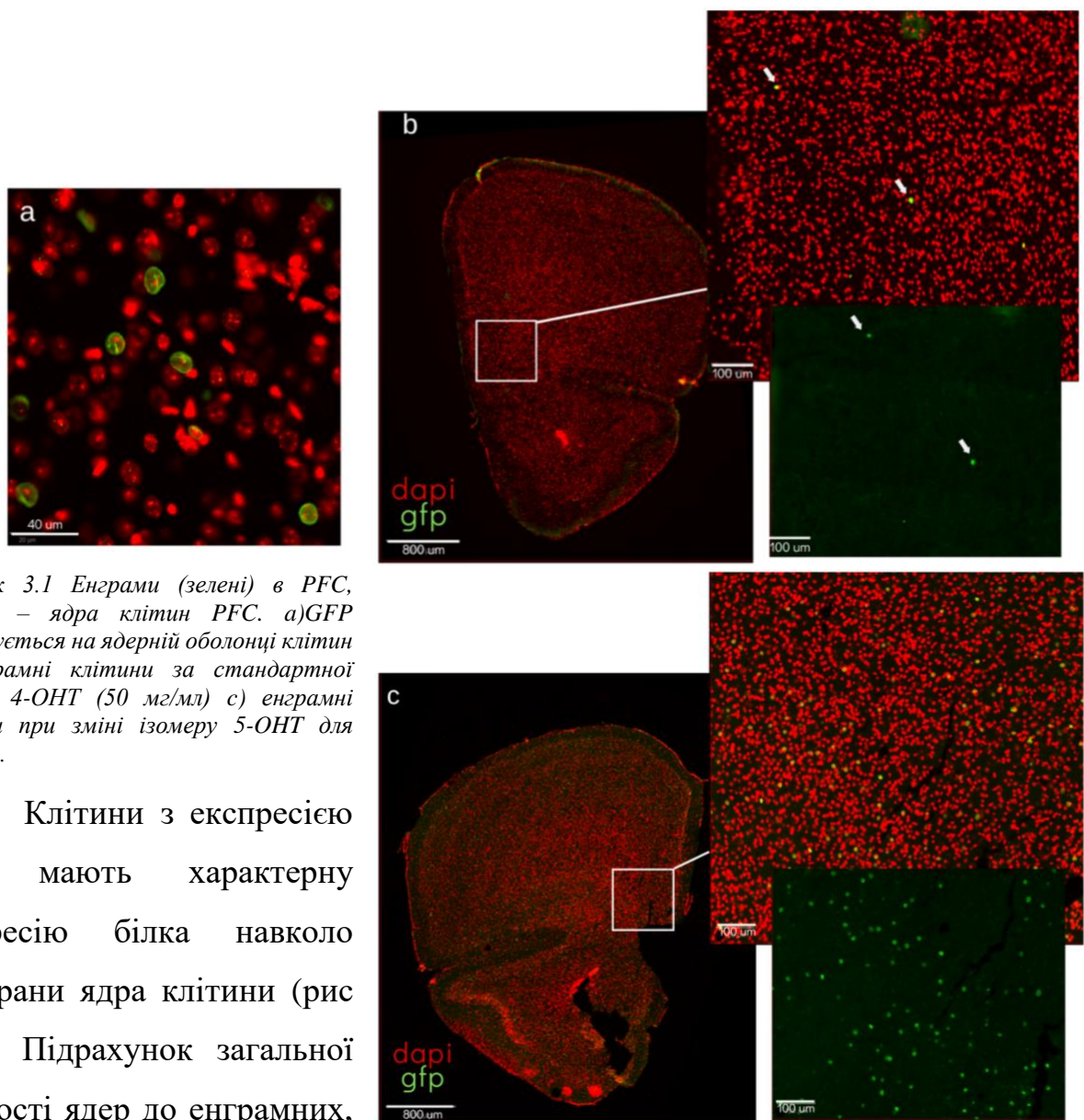


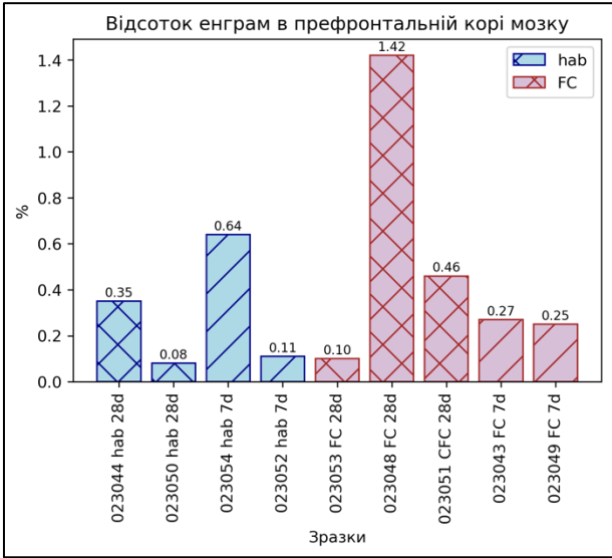
Рисунок 3.1 Енграми (зелені) в PFC, червоні – ядра клітин PFC. а)GFP локалізується на ядерній оболонці клітин б) енграмні клітини за стандартної ін'єкції 4-ОНТ (50 мг/мл) с) енграмні клітини при зміні ізомеру 5-ОНТ для ін'єкції.

Клітини з експресією GFP мають характерну експресію білка навколо мембрани ядра клітини (рис 3.1a). Підрахунок загальної кількості ядер до енграмних, показав наявність GFP клітин у кількості 0.08-1.42% (рис 3.1b, графік 3.1). Не було виявлено статистичної кореляції між кількістю позитивних клітин у

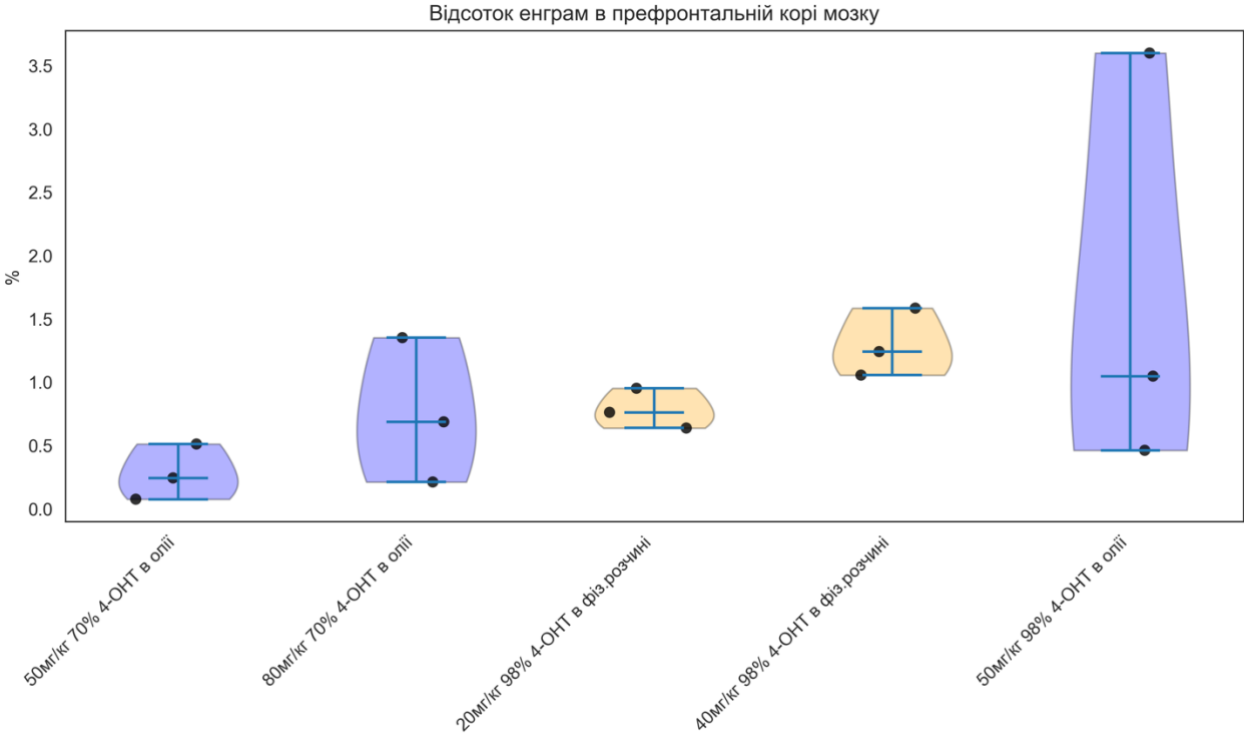
мишей контрольної групи та зумовлення страху, а також груп 7 днів або 28 дні після розтину .

Цієї кількості клітин було недостатньо для сортування FANS та проведення секвенування, тому було вирішено провести повторний експеримент з різною концентрацією 4-ОНТ, а також з використанням різної чистоти Z-ізомеру 4-ОНТ: 70% та 98%. Було

змінено концентрації 4-гідрокситамоксифену у розчинах олії або фізіологічному розчині та проведено тест з 5 умовами ін'єкцій (графік 3.2).



Графік 3.1 Графік порівняння енграм між різними умовами hab— контрольна група, FC— зумовлення страху, CFC— слабе зумовлення страху.



Графік 3.2 Порівняння кількості енграм при застосуванні різних концентрацій та умов приготування 4-ОНТ.

Ми помітили, що використання Z-ізомеру 98% 4-ОНТ значно покращує кількість енграм в зразках. Статистичний аналіз Tukey's HSD test з урахуванням результатів з попередньої групи показав статистичну відмінність

між групами 50 мг/кг 70% 4-ОНТ в олії (умова, яку ми планували використовувати) та 50 мг/кг 98% 4-ОНТ в олії з  $p\text{-value}=0,0358$ , зі збільшенням кількості енграмних клітин у приблизно 4 рази.

Тест на стандартне відхилення показав, що група з використанням фізіологічного розчину має більш нормальний розподіл даних порівняно з групою розчинення 4-ОНТ в олії (0.175 порівняно з 0.67) У зв'язку з більшим розподілом даних при використанні 50 мг/кг 98% 4-ОНТ було вирішено використовувати ін'єкцію 98% 4-ОНТ з концентрацією 40 мг/кг, розчинену у фізіологічному розчині, яка показує більш стабільні результати.

Тож, в ході цих експериментів було встановлено оптимальну концентрацію 4-ОНТ для експресії GFP-позитивних енграмних клітин. Також було підтверджено, що у зразках без ін'єкції тамоксифену, не було зафіксовано експресії GFP, що доводить доцільність використання мишей лінії TRAP2-Sun1-sfGFP у ході подальших експериментів для дослідження клітин пам'яті.

### **3.2 Виділення ядер**

Для подальшої підготовки якісних бібліотек для секвенування було підтверджено цілісність та чистоту виділених ядер, а також кількість необхідних ядер для проведення майбутнього аналізу.

У ході виділення ядер за допомогою градієнтної техніки з PFC однієї півкулі, було з'ясовано, що можна виділити 200- 300 тисяч ядер високої якості і цілісності (рис. 3.2). Ця кількість є достатньою для якісного scRNA-seq та свідчить про невелику втрату при фільтраційних етапах.

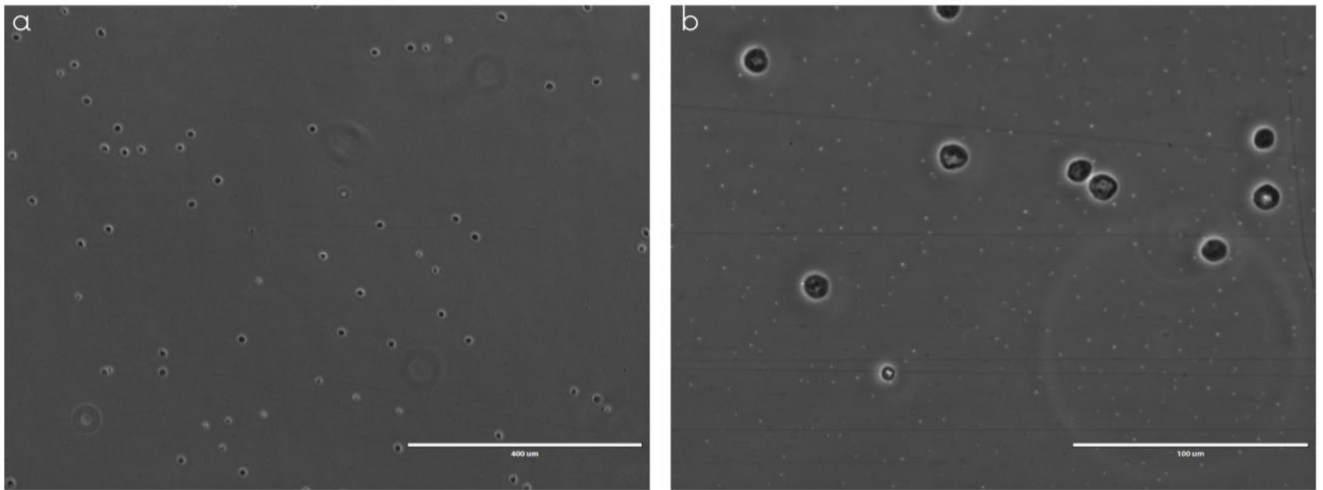
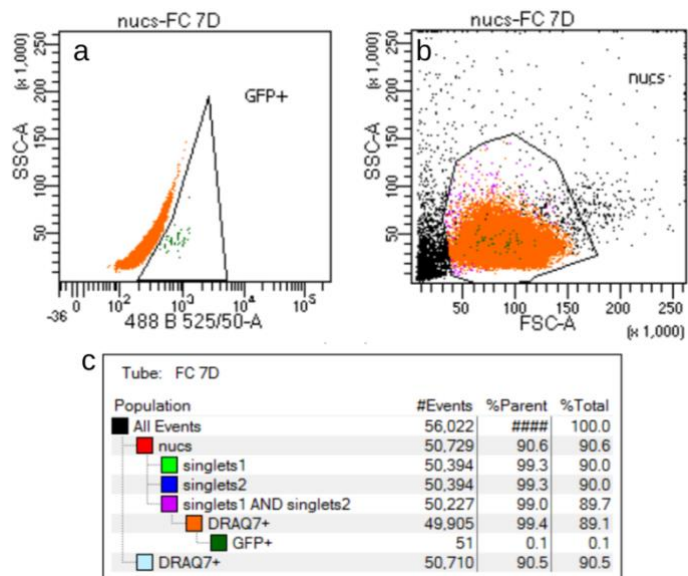


Рисунок 3.2. Зображення виділених ядер в фазово-контрастній мікроскопії а)10х б)40х

При проведенні сортування ядер було виявлено, що загальна кількість неушкоджених ядер становить приблизно 90% від загальної популяції (графік 3.3с). Це вказує на низьку кількість дебрису.

При сортуванні клітин технологією FANS для виокремлення GFP-експресованих клітин, було виявлено популяцію GFP клітин, але цієї кількості було недостатньо для сорту в одну 384-луночну плашку (графік 3.3а). Тому наступними етапами має бути сортування клітин з мишею іншої експериментальної групи, в яких був використаний 4-ОНТ 98% Z-ізомер розвединий у фізіологічному розчині, тестування яких було проведено раніше та описано в попередньому етапі.



Графік 3.3. Результат сортування ядер FANS

а) популяція GFP-позитивних ядер б) відокремлення

ядер від контамінантів с) графік розподілу популяції ядер

### 3.3 Перевірка якості РНК

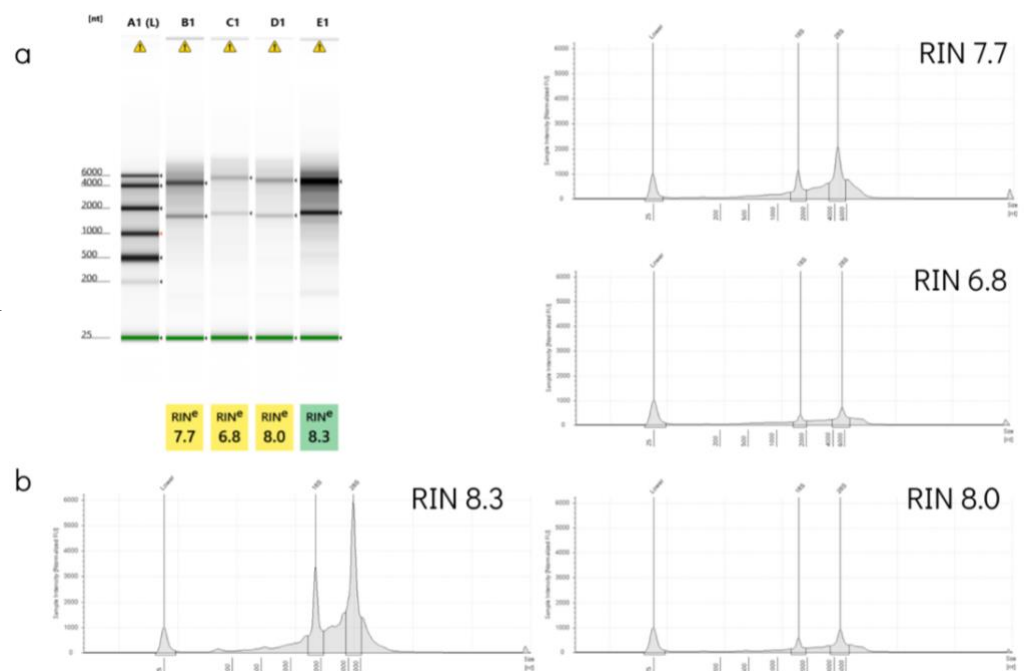
Для проведення scRNA-seq важливо забезпечити цілісність молекул РНК, щоб точно відтворити моментальний стан експресії генів. У нашій роботі ми використали колонковий метод для виділення РНК та мікрокапілярне електрофоретичне розділення РНК для автоматизованого високопродуктивного підходу до оцінки цілісності зразків РНК. Цей метод використовує байєсівську техніку навчання, автоматично вибирає характеристики з вимірювань сигналу та будує регресійні моделі. Отриманий алгоритм є незалежним від користувача, автоматизованим та надійним для стандартизації контролю якості РНК. Він дозволяє розрахувати число цілісності РНК (RIN) шляхом оцінки його параметрів [41].

У вашому випадку було проаналізовано 4 зразки для отримання статистичних даних. Отримані значення RIN складають 7.7, 6.8, 8.0 і 8.3 (графік 3.4а). Чим вище значення RIN, тим вища якість і цілісність РНК. Високі значення RIN (наприклад, близько 8.0 і вище) свідчать про добру цілісність РНК, тоді як низькі значення RIN (наприклад, менше 6.5) можуть вказувати на погану цілісність РНК.

Графік 3.4

a) Мікрокапілярне електрофоретичне розділення РНК

b) Електрофореграми РНК та їх відповідність до RIN



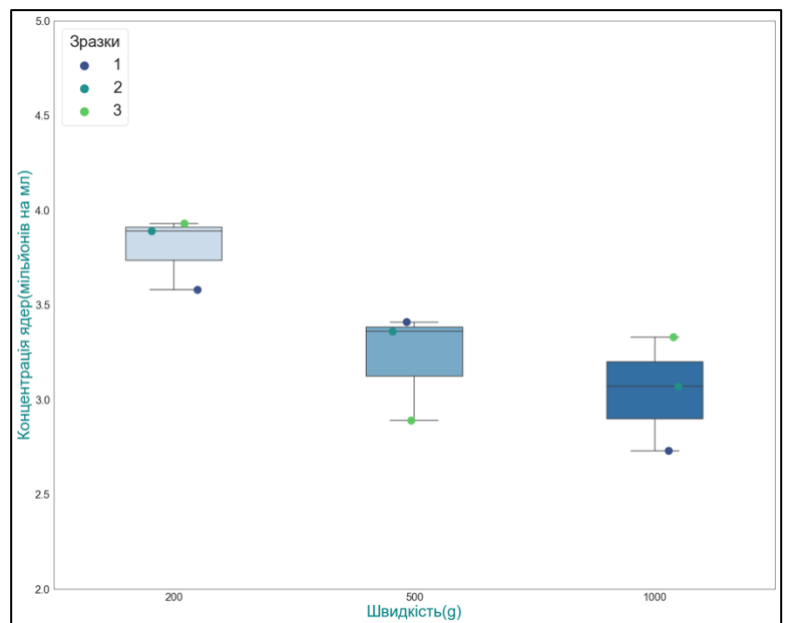
На підставі отриманих значень RIN можна зробити висновок щодо придатності зразків для подальшого секвенування РНК. Зразки з високими значеннями RIN відповідають зразкам з доброю цілісністю РНК і, можуть бути використані для секвенування РНК з надійними результатами. Однак, зразки з низькими значеннями RIN можуть потребувати додаткових досліджень та оптимізації перед застосуванням для секвенування РНК.

### 3.4 Фіксаційні етапи

У фіксаційних етапах дослідження використовувався набір Parse Bioscience fixation kit. Ми вирішили перевірити ефективність центрифугування, описану у протоколі, оскільки фіксаційний етап дослідження вимагає ефективного осадження ядер та збереження їхньої кількості. При використанні набору необхідно переконатися, що цей процес ефективний. Шляхом тестування

різних швидкостей центрифугування ми могли оцінити, як швидкість впливає на осадження ядер. Перевірка ефективності осадження дозволяє забезпечити, що ядра залишаються у преципітаті після центрифугування, а не переходять у супернатант.

Якщо ядра не зберігаються належним чином, може статися втрата або пошкодження зразків, що впливає на подальші етапи дослідження.



Графік 3.5 Концентрація ядер після центрифугування при різних швидкостях (200, 500 та 1000 g)

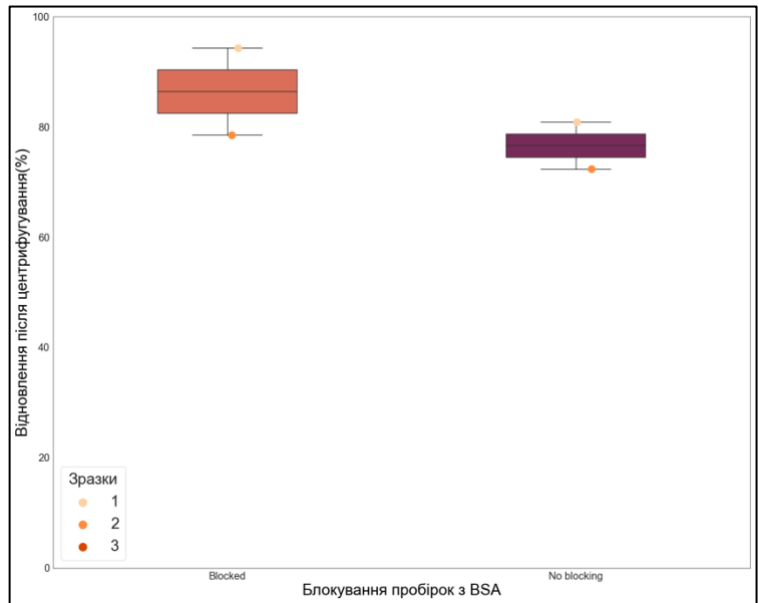
Було проведено тестування різних швидкостей центрифугування, щоб перевірити ефективність осадження ядер. Початкові експерименти з різними швидкостями (200, 500 та 1000 g) показали, що кількість ядер зменшується при збільшенні швидкості осадження (графік 3.5). Це може бути пов'язано з тим,

що ядра при високих швидкостях починають руйнуватись та злипатися, що унеможливило їх подальше використання після фільтрування.

Для підвищення виходу ядер після центрифугування було вирішено використовувати пробірки, заблоковані BSA.

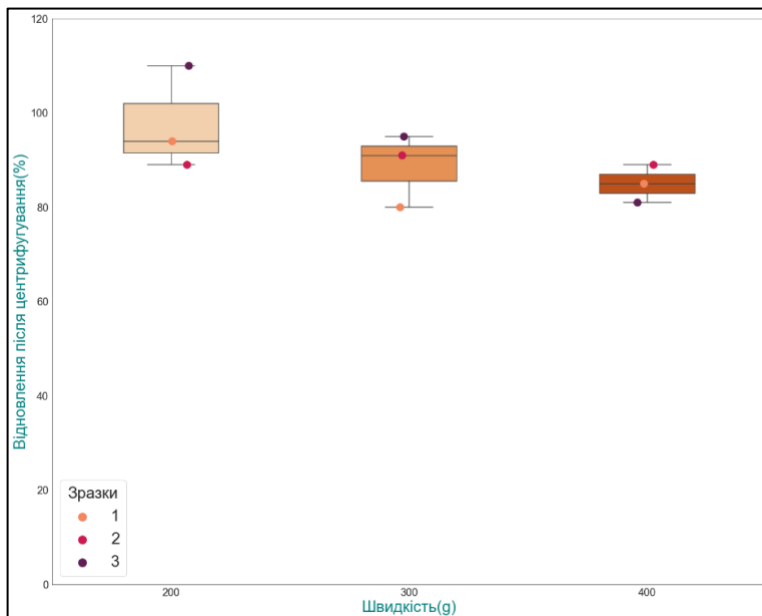
Це дозволило понизити адсорбцію ядер на стінках

пробірки і зберегти більшу кількість ядер. Заблоковані пробірки показали на 11% більшу ефективність у збереженні ядер порівняно з незаблокованими пробірками (графік 3.6).



Графік 3.6 Відновлення ядер після центрифугування з блокуванням пробірок або без нього.

Наступним етапом було використання заблокованих пробірок для тестування різних швидкостей центрифугування (200, 300 та 400 g).



Графік 3.7 Відновлення ядер після центрифугування при різних швидкостях (200, 300 та 400 g)

результаті експерименту було виявлено, що оптимальною швидкістю для центрифугування є 200 g (графік 3.7). Це цікаве спостереження, оскільки очікувалося, що більша швидкість призведе до більшого осадження ядер на дно пробірки. Проте, при такому збільшенні швидкості осадження, ядра піддаються

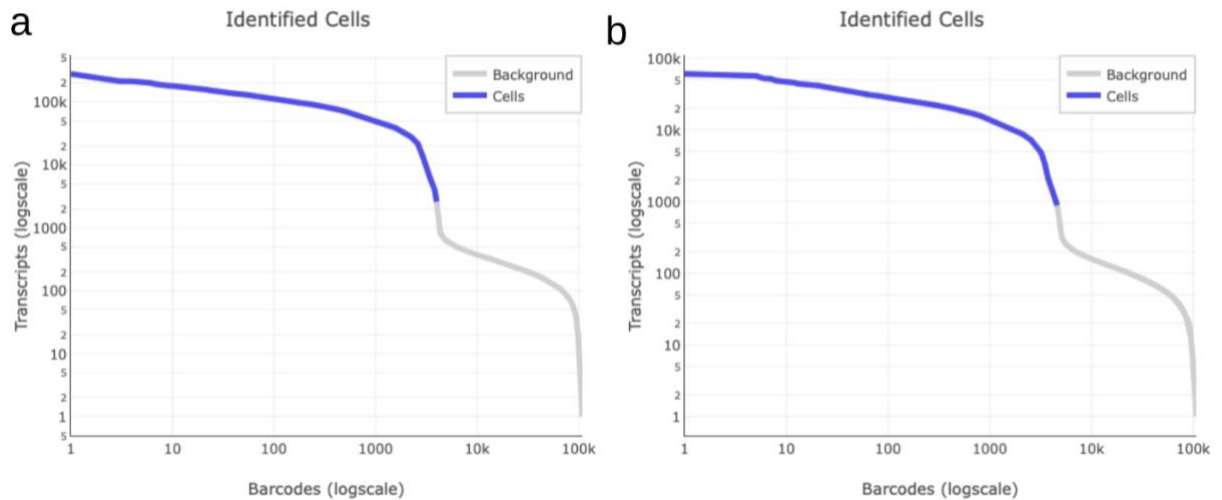
більшому руйнуванню та злипанню.

Таким чином, на основі результатів експериментів, можна зробити висновок, що використання заблокованих з BSA пробірок поліпшує вихід ядер після центрифугування. Оптимальною швидкістю центрифугування для заблокованих пробірок виявилась 200 g, що може бути зв'язано з компромісом між ефективним осадженням ядер і запобіганням їх руйнуванню.

### 3.5 Пробіги scRNA-seq на випробувальних зразках

Ми вирішили провести пробне випробування на одному зразку тканини гіпокампу при використанні двох умов секвенування: 20 і 90 тисяч прочитаних послідовностей на ядро. Були отримані такі результати:

Характеристики секвенування	20 тисяч	90 тисяч
Оціночна кількість ядер	4603	3985
Медіана транскриптів на ядро	7987	31402
Медіана генів на ядро	2792	5484
Середня кількість прочитаних послідовностей на ядро	18866	98366
Загальна кількість прочитаних послідовностей	86849829	356125120
Насиченість секвенування	0.096	0.305
BC1 (RT) >Q30:	0.0872	0.874
BC2 >Q30	0.904	0.898
BC3 >Q30	0.945	0.94
cDNA >Q30	0.919	0.922



Графік 3.8 Ідентифікація ядер і транскриптів при первинному аналізі секвенування за допомогою Parse pipeline a) ідентифікація транскриптів при 90 тис. читань b) 20 тис. читань

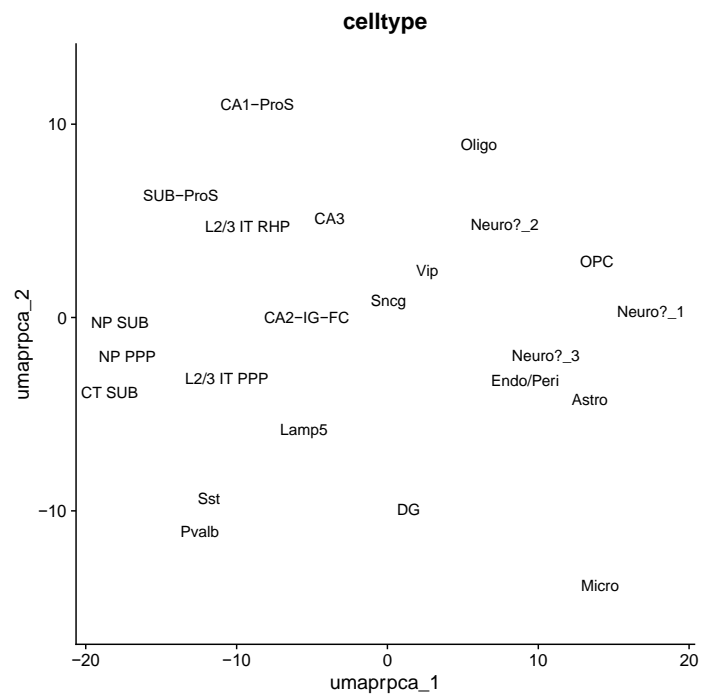
Результати показують, що на 20 тис. прочитаних послідовностей було ідентифіковано на 618 більше ядер, порівняно з 90 тис. Також на 90 тис. читань спостерігалась більша кількість транскриптів та генів на ядро порівняно з 20 тисяч. На 90 тис. читань було здійснено більшу кількість прочитаних послідовностей, що відображається більшою глибиною секвенування та детальнішому покриттю геному, ніж на 20 тис. читань.

Результати порівняльного аналізу показують, що використання 90 тис. читань у порівнянні з 20 тис. читань має свої переваги та обмеження. Зокрема, на 90 тис. читань спостерігається вища насиченість секвенування, що вказує на більш повне відображення генетичної інформації в зразку. Також на 90 тис. читань було ідентифіковано більше транскриптів та генів на клітину, а також було прочитано більше послідовностей. Однак, якість послідовностей була високою як на 90 тис. читань, так і на 20 тис. читань.

Також було проведено вторинний аналіз результатів секвенування з подальшим виділенням субтипів клітин у гіпокампі (графік 3.9). Виявилось

можливим ідентифікувати типи клітин, такі як різні типи нейронів та нейроглії.

З урахуванням цих результатів, можна зробити висновок, що використання 20 тисяч прочитаних послідовностей є прийнятною стратегією, оскільки такий підхід є менш фінансово витратним і все ж може розкрити геном на високому рівні, забезпечуючи достатню



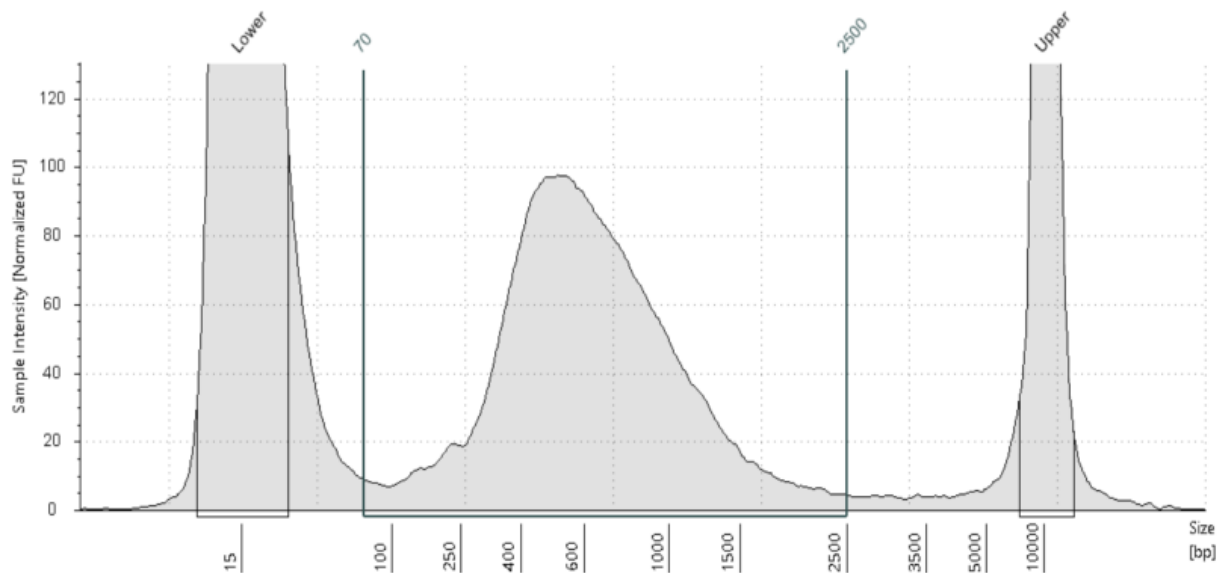
Графік 3.9 Кластер підтипів клітин гіпокампу під час вторинного аналізу

інформацію про генетичну активність та зберігаючи якість секвенування. При проведенні подальших досліджень варто враховувати ці фактори та обмеження, щоб вибрати найбільш ефективний підхід для ефективного секвенування PFC мозку мишей.

### 3.6 Підготовка бібліотек snmC-seq2

У цьому етапі нашого дослідження ми зосереджувалися на експериментальній частині підготовки бібліотеки для snmC-seq2 з метою підтвердження відтворюваності протоколу.

Хоча секвенування ще не було здійснено, наші результати насправді вказують на те, що ми успішно виконали етапи експерименту згідно з протоколом. Це підтверджує його відтворюваність. Електрофореграма підготовлена за доповогою TapeStation на графіку 3.10 вказує на хорошу якість підготовленої бібліотеки з розподілом піку на відповідному рівні.



Графік 3.10 Електрофореграма бібліотеки *snmC-seq2*

Крім того, ми автоматизуємо процес метилювання ДНК, використовуючи піпетуючого робота Biomek i5 (рис 3.3b). Це вдосконалення допоможе нам уникнути багатоетапних операцій піпетування на 384-луночну плашку, забезпечуючи більшу точність та ефективність при великій кількості зразків.

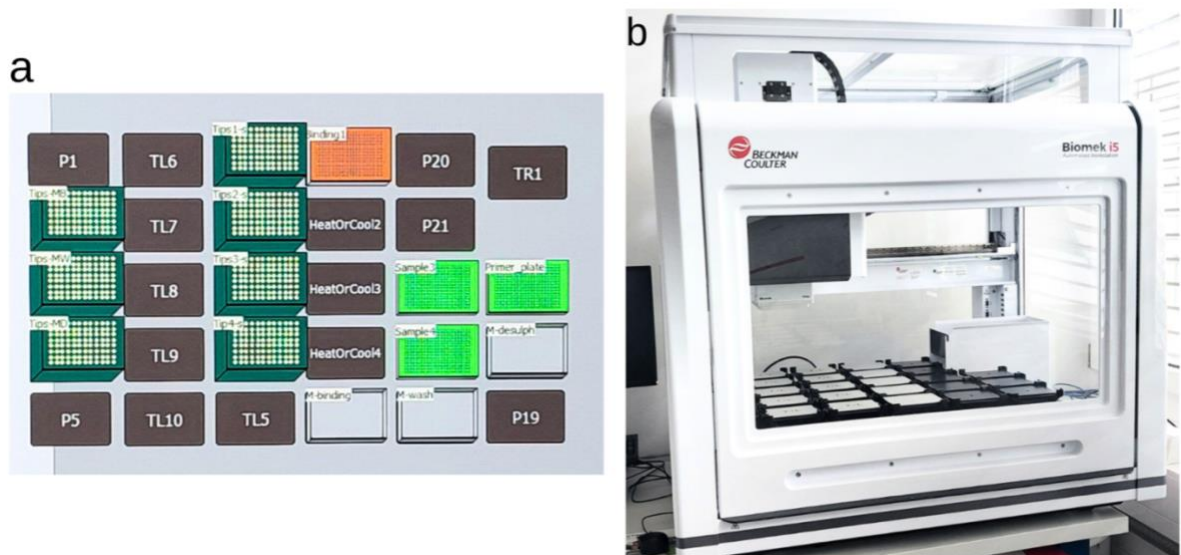


Рисунок 3.3 а) створення автоматизованого протоколу *snmC-seq2* б) автоматизований піпетуючий робот Biomek i5

Хоча наші дослідження на даному етапі були спрямовані на валідацію відтворюваності протоколу та автоматизації процесу, у подальшому ми можемо розпочати перші секвенування *snmC-seq2*. Це дозволить нам

розширити наші можливості дослідження і отримати більш детальні дані щодо профілювання метилювання ДНК на рівні окремих клітин.

## РОЗДІЛ IV ВИСНОВКИ

Завдання даної роботи були успішно виконані і були отримані такі результати:

1. Використовуючи парадигму зумовлення страху на трансгенній лінії мишей TRAP2-Sun1-sfGFP, було успішно проведено поведінкові експерименти.
2. Застосовуючи імуногістохімічні методи було встановлено оптимальну концентрацію 4-ОНТ та порівняно методи приготування ін'єкції для експресії GFP-позитивних енграмних клітин. Також було підтверджено специфічність сигналу, оскільки у зразках без ін'єкції 4-гідрокситамоксифену, не було зафіксовано експресії GFP, що доводить доцільність використання мишей лінії TRAP2-Sun1-sfGFP у ході подальших експериментів.
3. У результаті виділення ядер було підтверджено їх цілісність, чистоту та достатню кількість для подальшого секвенування. Градієнтна техніка дозволила успішно виділити 200-300 тисяч ядер PFC, які мали високу якість та цілісність. Сортування ядер показало, що близько 90% з них були неушкодженими, що свідчить про низьку кількість контамінантів. Однак, популяція GFP-ядер була недостатньою для дальшого опрацювання. Планується провести сортування з іншої експериментальної групи для отримання достатньої кількості ядер для подальшого аналізу.
4. Було проведено валідацію якості РНК і отримані значення RIN складають 7.7, 6.8, 8.0 і 8.3. Такі зразки можуть бути використані для sc-RNA-seq.
5. Під час фіксування ядер, використання заблокованих з BSA пробірок покращує вихід ядер після центрифугування. Оптимальною швидкістю центрифугування для заблокованих пробірок виявилась 200 g, що може

бути зв'язано з компромісом між ефективним осадженням ядер і запобіганням їх руйнуванню.

6. Пробне секвенування scRNA-seq дозволило оцінити наскільки добре метод працює у наших умовах дослідження та визначити оптимальні параметри читань послідовностей для подальшого розширення обсягу секвенування.
7. При відтворенні протоколу snmC-seq2 отримано якісну бібліотеку метилювання ДНК. Вона потребує секвенування та аналізу результатів. Проте ми можемо стверджувати, що протокол відтворюваний та може використовуватись у майбутньому.

Загалом, результати дослідження підтверджують успішність проведених етапів підготовки та оптимізації протоколів для дослідження травматичної пам'яті на рівні одиночних клітин. Це створює основу для подальшого вивчення механізмів травматичної пам'яті з використанням сучасних методів аналізу scRNA-seq та snmC-seq2. Та дозволить нам продовжити дослідження на великій кількості зразків та перейти до біоінформатичного аналізу результатів.

### Список використаних джерел:

- 1 R. Adolphs The biology of fear *Curr. Biol.*, 23 (2013), pp. R79-R93
- 2 Strange D and Takarangi MKT (2015) Memory distortion for traumatic events: the role of mental imagery. *Front. Psychiatry* 6:27. doi: 10.3389/fpsy.2015.00027
- 3 Asok A, Kandel ER and Rayman JB (2019) The Neurobiology of Fear Generalization. *Front. Behav. Neurosci.* 12:329. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00329
- 4 Camina E and Güell F (2017) The Neuroanatomical, Neurophysiological and Psychological Basis of Memory: Current Models and Their Origins. *Front. Pharmacol.* 8:438. doi: 10.3389/fphar.2017.00438
- 5 Roozendaal, B., McEwen, B. & Chattarji, S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10, 423–433 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrn2651>
- 6 Cullen, P. K., Gilman, T. L., Winiecki, P., Riccio, D. C., and Jasnow, A. M. (2015). Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol. Learn. Mem.* 124, 19–27. doi: 10.1016/j.nlm.2015.07.001
- 7 Rozeske, R. R., Valerio, S., Chaudun, F., and Herry, C. (2015). Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes Brain Behav.* 14, 22–36. doi: 10.1111/gbb.12181
- 8 Laubach M, Amarante LM, Swanson K, White SR. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eNeuro.* 2018 Oct 25;5(5):ENEURO.0315-18.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0315-18.2018. PMID: 30406193; PMCID: PMC6220587.
- 9 Nejati V, Majdi R, Salehinejad MA, Nitsche MA. The role of dorsolateral and ventromedial prefrontal cortex in the processing of emotional dimensions. *Sci Rep.* 2021 Jan 21;11(1):1971. doi: 10.1038/s41598-021-81454-7. PMID: 33479323; PMCID: PMC7819980.
- 10 Memory concepts H.L. Roedinger, Y. Dudai, S.M.Fitzpatrick (Eds.), *Science of Memory: Concepts*, Oxford University Press, New York, NY (2007), pp. 1-9
- 11 R. Semon Die mneme [The mneme] Engelmann W, Leipzig (1904)

- 12 Liu, X., Ramirez, S., Redondo, R. L., & Tonegawa, S. (2014). Identification and manipulation of memory engram cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 79, 59–65. doi:10.1101/sqb.2014.79.024901
- 13 Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., & Redondo, R. (2015). Memory engram cells have come of age. *Neuron*, 87(5), 918–931. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.002
- 14 Josselyn, S. A., Kohler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 521–534. doi:10.1038/nrn4000
- 15 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. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 79. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00079.
- 16 Dudai, Y. & Eisenberg, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44, 93–100 (2004).
- 17 DeNardo LA, Liu CD, Allen WE, Adams EL, Friedmann D, Fu L, Guenthner CJ, Tessier-Lavigne M, Luo L. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nat Neurosci*. 2019 Mar;22(3):460-469. doi: 10.1038/s41593-018-0318-7. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30692687; PMCID: PMC6387639.
- 18 Abraham, W.C., Jones, O.D. & Glanzman, D.L. Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage?. *npj Sci. Learn.* 4, 9 (2019). doi: 10.1038/s41539-019-0048-y
- 19 Fox K, Stryker M. Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017 Mar 5;372(1715):20160413. doi: 10.1098/rstb.2016.0413. PMID: 28093560; PMCID: PMC5247598.
- 20 Saha, R. N., et al. (2011). Rapid activity-induced transcription of Arc and other IEGs relies on poised RNA polymerase II. *Nat. Neurosci.* 14, 848–856.
- 21 Bramham, C., Wells, D. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8, 776–789 (2007). doi: 10.1038/nrn2150
- 22 Levenson, J., Sweatt, J. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 6, 108–118 (2005). doi: 10.1038/nrn1604

- 23 Levenson, J. M. et al. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 279, 40545–40559 (2004).
- 24 Albo Z, Gräff J. 2018 The mysteries of remote memory. *Phil. Trans. R. Soc. B* 373: 20170029.
- 25 Ofengeim D, Giagtzoglou N, Huh D, Zou C, Yuan J. Single-Cell RNA Sequencing: Unraveling the Brain One Cell at a Time. *Trends Mol Med.* 2017 Jun;23(6):563-576. doi: 10.1016/j.molmed.2017.04.006. Epub 2017 May 10. PMID: 28501348; PMCID: PMC5531055.
- 26 Zhang Y, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014;34(36):11929–47.
- 27 Ofengeim D, Giagtzoglou N, Huh D, Zou C, Yuan J. Single-Cell RNA Sequencing: Unraveling the Brain One Cell at a Time. *Trends Mol Med.* 2017 Jun;23(6):563-576. doi: 10.1016/j.molmed.2017.04.006. Epub 2017 May 10. PMID: 28501348; PMCID: PMC5531055.
- 28 Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol.* 2015 May;33(5):495-502. doi: 10.1038/nbt.3192. Epub 2015 Apr 13. PMID: 25867923; PMCID: PMC4430369.
- 29 Van de Sande, B., Lee, J.S., Mutasa-Gottgens, E. *et al.* Applications of single-cell RNA sequencing in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **22**, 496–520 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00688-4>
- 30 Starnawska A, Demontis D. Role of DNA Methylation in Mediating Genetic Risk of Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry.* 2021 Apr 1;12:596821. doi: 10.3389/fpsy.2021.596821. PMID: 33868039; PMCID: PMC8049112.
- 31 Suzuki M.M., Bird A. DNA Methylation Landscapes: Provocative Insights from Epigenomics. *Nat. Rev. Genet* 2008;9:465–476. doi: 10.1038/nrg2341.
- 32 Moore L.D., Le T., Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38:23–38. doi: 10.1038/npp.2012.112.
- 33 Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J.R., Lee L., Ye Z., Ngo Q.-M., et al. Human DNA Methylomes at Base

- Resolution Show Widespread Epigenomic Differences. *Nature*. 2009;462:315–322. doi: 10.1038/nature08514.
- 34 Hernando-Herraez I., Garcia-Perez R., Sharp A.J., Marques-Bonet T. DNA Methylation: Insights into Human Evolution. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005661. doi: 10.1371/journal.pgen.1005661.
- 35 Deaton A.M., Bird A. CpG Islands and the Regulation of Transcription. *Genes Dev*. 2011;25:1010–1022. doi: 10.1101/gad.2037511.
- 36 Miranda T.B., Jones P.A. DNA Methylation: The Nuts and Bolts of Repression. *J. Cell. Physiol*. 2007;213:384–390. doi: 10.1002/jcp.21224.
- 37 Ball M.P., Li J.B., Gao Y., Lee J.-H., LeProust E.M., Park I.-H., Xie B., Daley G.Q., Church G.M. Targeted and Genome-Scale Strategies Reveal Gene-Body Methylation Signatures in Human Cells. *Nat. Biotechnol*. 2009;27:361–368. doi: 10.1038/nbt.1533.
- 38 Luo C, Keown CL, Kurihara L, Zhou J, He Y, Li J, Castanon R, Lucero J, Nery JR, Sandoval JP, Bui B, Sejnowski TJ, Harkins TT, Mukamel EA, Behrens MM, Ecker JR. Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. *Science*. 2017 Aug 11;357(6351):600-604. doi: 10.1126/science.aan3351. PMID: 28798132; PMCID: PMC5570439.
- 39 Luo C, Rivkin A, Zhou J, Sandoval JP, Kurihara L, Lucero J, Castanon R, Nery JR, Pinto-Duarte A, Bui B, Fitzpatrick C, O'Connor C, Ruga S, Van Eden ME, Davis DA, Mash DC, Behrens MM, Ecker JR. Robust single-cell DNA methylome profiling with snmC-seq2. *Nat Commun*. 2018 Sep 20;9(1):3824. doi: 10.1038/s41467-018-06355-2. PMID: 30237449; PMCID: PMC6147798.
- 40 Moore, L., Le, T. & Fan, G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* 38, 23–38 (2013). doi: 10.1038/npp.2012.112
- 41 Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S. *et al*. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biol* 7, 3 (2006) doi: 10.1186/1471-2199-7-3