

2. Összefoglalás

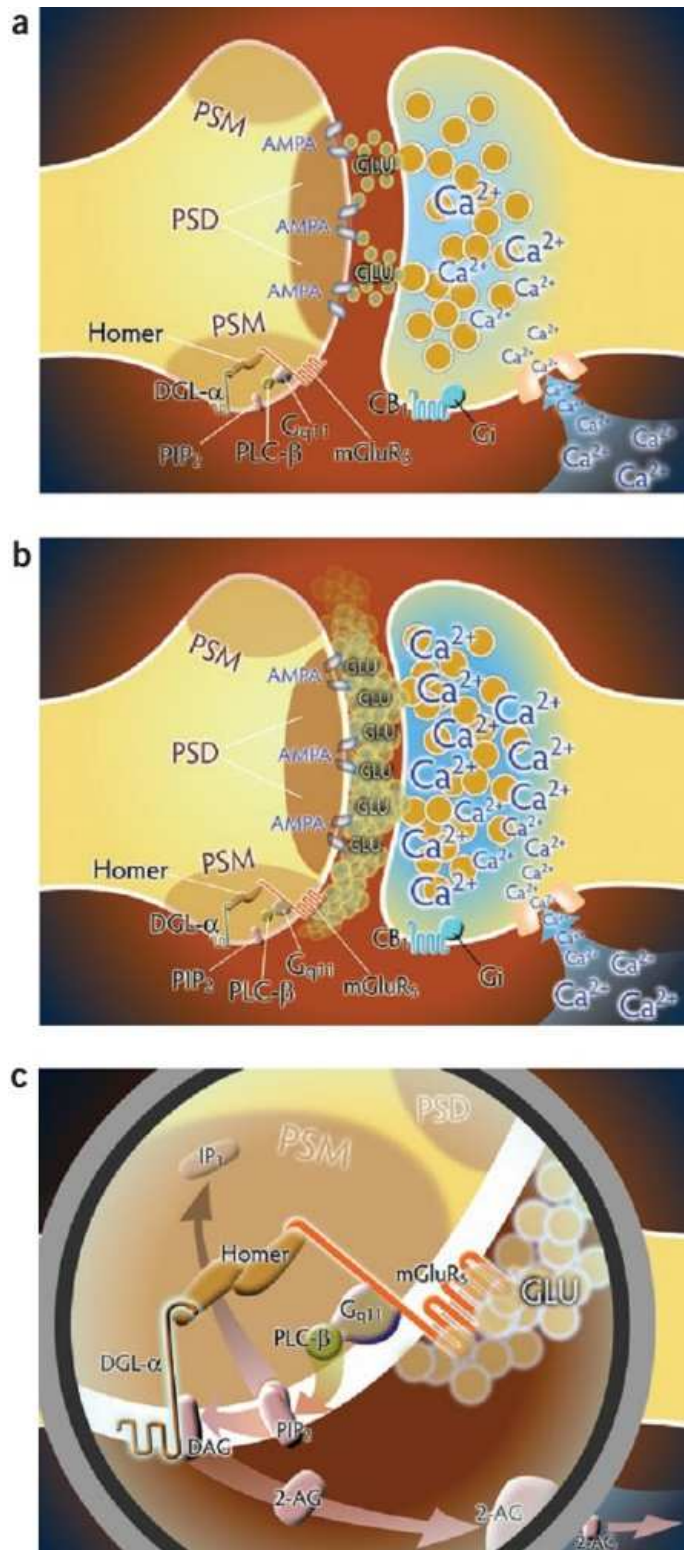
Az agy kémiai szinapszisainak működési elvei és plaszticitási folyamatai nem érthetőek meg a szinaptikus fehérjék helyzetének és mennyiségének ismerete nélkül. Az endokannabinoid jelpálya a központi idegrendszer számos különböző típusú szinapszisában kulcsszerepet játszik az ingerület-átvivő anyagok felszabadulásának szabályozásában. Ennek ellenére az idegvégződéseken található, retrográd jelátvitelt közvetítő CB₁ kannabinoid receptorok mennyiségének és sejten belüli eloszlásának szabályozásáról nagyon kevés ismeret áll rendelkezésre. A CB₁ receptorok nanoskálájú molekuláris eloszlásának feltérképezéséhez a Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópiát (STORM) választottuk eszközzül, amellyel a hagyományos fénymikroszkópia térbeli feloldóképességét egy nagyságrenddel meghaladó felbontás is elérhető. A STORM módszert konfokális mikroszkópiával kombinálva a molekuláris eloszlásra vonatkozó szuperrezolúciós adatokat sejt- és kompartmentspecifikus kontextusba helyezve vizsgáltuk. A különböző modalitású képek egységes kiértékeléséhez és a STORM adatok pontonkénti analíziséhez egy könnyen kezelhető, rugalmas szoftvert fejlesztettünk. Perfundált egéragy metszeteken kettős fluoreszcens immunfestést végeztünk CB₁ és neuroligin-2 ellen, és a hippocampusz CA1 piramisrétegében korrelált konfokális és STORM képeket vettünk fel. A posztzinaptikus aktív zóna marker neuroligin-2 konfokális képének segítségével meghatároztuk a gátló szinapszisok helyzetét. Kimutattuk, hogy az egyes axonvégzésekben a receptorok száma lineáris összefüggést mutat a bouton méretével, továbbá, hogy a CB₁ receptorok átlagos sűrűsége meglepő módon nem tér el az intraszinaptikus és az extraszinaptikus zónában. A tudományos diákköri munka keretén belül tehát elsőként fejlesztettünk szoftvert a STORM és konfokális mikroszkópiás adatok korrelált analíziséhez, valamint ennek segítségével kimutattuk a CB₁ receptorok homogén eloszlását a gátló axonvégzésekben.

3. Bevezetés

3. 1. A szinaptikus endokannabinoid jelpálya

Az agy szinaptikus szerveződésének minél teljesebb körű feltérképezése a molekuláris neuroanatómia egyik legfontosabb célja. A szinaptikus jelpályák molekuláris elemeinek kvantitatív vizsgálatával közelebb lehet jutni azok élettani és kórélettani funkciójához, így lehetőség nyílt akár olyan új gyógyszerek tervezésére, amelyek hatékonyabbak lehetnek különböző idegrendszeri betegségek esetében [1]. Így történt ez az endokannabinoid jelpálya molekuláris alkotóelemeinek, a CB₁ kannabinoid receptornak [2], a DGL- α (diacilglicerol-lipáz- α) [3] és az MGL (monoacilglicerol-lipáz) [4] enzimeknek esetében is. A neuroanatómiai lokalizáció segítségével kiderült, hogy a szinaptikus endokannabinoid jelpálya retrográd jelátvitelt tesz lehetővé [5-7] (1. ábra). A retrográd endokannabinoid útvonalnak az egyik legfontosabb feladata, hogy kóros preszinaptikus hiperaktivitás esetén megvédje a posztzinaptikus idegsejtet a túlzott serkentéstől [8]. Ennek a mechanizmusnak kórélettani jelentősége lehet például stressz- indukálta analgéziában [9], illetve epilepsziában [10]. Ugyanakkor a fiziológiai és patofiziológiai funkciók sokféleségének további megismeréséhez elengedhetetlen az endokannabinoid rendszer molekuláris felépítésének részletesebb feltérképezése a különböző szinaptikus kapcsolatokban.

Az elmúlt évtizedekben számos betegség esetében találtak biztató jeleket arra, hogy az endokannabinoid rendszer modulálásával be lehet avatkozni kóros folyamatokba. Erre példák a pszichiátriai és neurológiai megbetegedések (például a Parkinson-kór vagy a Huntington-kór, a krónikus neuropátiás fájdalom, a sclerosis multiplex), különböző daganatos megbetegedések, az ateroszklerózis, a miokardiális infarktus, a stroke, a magas vérnyomás, a szürkehályog, a metabolikus szindróma és a csontritkulás [1]. Egyes betegségekben már megkezdődött a CB₁ receptor egyik exogén ligandjának, a THC-nak különböző standardizált preparátumok formájában történő orvosi célú alkalmazása is. Emellett egyre növekszik a kannabisz felhasználása és elfogadottsága rekreációs drokként, sőt néhány országban és az USA egyes tagállamaiban már legálissá tették a használatát. Így ezen megfontolások miatt is szükséges az endokannabinoid rendszer kiterjedt vizsgálata, hiszen a hosszú távú THC-használat toleranciát és egyes kognitív funkciók visszaesését okozhatja [11].



1. ábra Az endokannabinoid-közvetítette retrográd szinaptikus jelátvitel feltételezett élettani szerepének bemutatása a glutamáterg szinapszis példáján [8]

a) A preszinaptikus sejtben az érkező akciós potenciál következtében az axonvégződésben feszültségfüggő kalciumcsatornák nyílnak ki. Ennek hatására kalcium-beáramlás figyelhető meg, ami segíti a neurotranszmittert (jelen esetben glutamátot - GLU) tartalmazó vezikula fúzióját a membránnal, így annak tartalma a szinaptikus résbe ürül, és átdiffundál a posztzinaptikus sejt membránjához, ahol a posztzinaptikus denzitás (PSD) területén receptoraihoz (itt ionotróp AMPA és NMDA) kötődik. Ennek hatására posztzinaptikus ionáramok jelennek meg (itt pozitív ionok áramlanak be, tehát a sejt depolarizálódik).

b) Kiterjedt preszinaptikus aktivitás esetén, amely az axonterminális területén emelkedett Ca^{2+} -koncentrációval jár együtt, glutamát áramlik ki a szinaptikus résből, majd a periszinaptikus jelátviteli egységben (Perisynaptic Signaling Machinery, PSM) metabotróp glutamátreceptorokat (mGluR) aktivál.

c) A PSM-ben a jelátvitel a mGluR₅ aktivációjával kezdődik, amely foszfolipáz-C- β (PLC- β) enzimtevékenységet idéz elő G_{q11} fehérje segítségével. A PLC- β foszfatidilinozitol-biszfoszfátot (PIP₂) hasít inozitol-triszfoszfáttá (IP₃) és diacilglicerollá (DAG), mely később a diacilglicerol-lipáz- α (DGL- α) enzim segítségével továbbalakul 2-arachidonoilglicerollá (2-AG). A posztzinaptikus sejt bocsátja tehát ki a 2-AG-t, amely visszadiffundál az axonvégződéshez, ahol a G-protein kapcsolt CB₁ receptoron indítja el a jelátvitelt. Ennek hatására záródnak a kalciumcsatornák, és csökken a túlzott neurotranszmitter-felszabadulás. Ez a „szinaptikus biztosíték” modell. (ábra: Katona és mtsai., módosítva)

3. 2. A CB₁ receptorok eloszlása

Az endokannabinoid rendszer a szinaptikus aktivitás fontos szabályozója számos agyterületen [12]. A CB₁ receptor retrográd jelátvitelben betöltött szerepét és jelentőségét epilepsziás hiperaktivásban elsőként a hippocampusz szinapszisaiban írták le [6, 13]. A hippocampusz a limbikus rendszer része, módosult kéregrészt, az emléknemok rögzítésében, illetve a térbeli tájékozódásban fontos agyterület [14]. Két nagyobb részre, a gyrus dentatusra és a cornu ammonisra (CA) tagolódik, utóbbi rágsálókban 1-től 3-ig számozott régiókból áll. A hippocampuszban GABA-erg interneuronok széles spektruma található meg, ezeket több mint 20 csoportba sorolhatjuk [15, 16]. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata szempontjából a cholecystokinint tartalmazó sejtek játszanak fontos szerepet, amelyek axonvégződéseiben CB₁ receptorok találhatók [2, 15]. Ilyenek a CCK-t expresszáló kosársejtek, a dendritikus sejtek, például a Schaffer-kollaterális asszociált sejtek és a perforáns pálya asszociált sejtek [16, 17].

Az endokannabinoid rendszer egyik kulcseleme, a CB₁ kannabinoid receptor az agyban a legnagyobb mennyiségben jelen lévő G-protein kapcsolt fehérje [18-23]. Legjelentősebb endogén ligandjai az anandamid és a 2-arachidonoyl-glycerol, exogén ligandja például a kender (*Cannabis sativa*) pszichoaktív hatóanyaga, a THC (Δ -9-tetrahydrocannabinol) [20-25]. Előfordulása nem csak az agyterületek szintjén változatos, hanem különböző sejtípusokban is különböző mértékben van jelen. A hippocampuszban legnagyobb mennyiségben GABA-erg interneuronok axonterminálásában helyezkedik el [2, 15], ám hatása a szinaptikus erősségre gátló és serkentő szinapszisokban egyaránt igazolt [6, 13]. Ezen túl egyes patofiziológiai folyamatok különbözőképpen változtathatják meg jelenlétét a különböző sejtípusokban. Például epilepsziás agyban - ahol a tünetek megjelenése a serkentés és gátlás felbomlásának következménye -, a serkentő szinapszisokban csökken [10], míg a gátló szinapszisokban nő a CB₁ receptor mennyisége [26]. Nem elég tehát csupán az agyterületre jellemző receptorszám-változást vizsgálni, hanem sejtípus-specifikus megközelítésre van szükség kvantitatív molekuláris vizsgálatok esetén.

Az ugyanazon axonvégződésben kifejeződő receptorok sem biztos viszont, hogy teljesen azonos szerepet töltenek be, akár csak a szinapszistól, illetve a downstream effektor molekuláktól való távolságuk miatt, ezért nem elegendő csupán a terminálison található összes receptor mennyiségét vizsgálni, hanem azok eloszlásának mérésére is szükség van.

A CB₁ receptorok nanoskálájú domén-specifikus elhelyezkedéséről és annak szabályozásáról viszont kevés ismeret áll rendelkezésünkre.

Beágyazás utáni immunarany technikát használó elektronmikroszkópos adatok szerint a CB₁ receptorok bedúsulása mutatható ki a szinapszis közelében hippokampális gátló interneuronokon [27]. Egy másik kutatócsoport viszont némileg az előzőeknek ellentmondó módon azt mutatta meg primer neuronális sejt kultúrában CB₁ fehérjékhez kötött kvantumpöttyök követése segítségével, hogy a receptorok szabadon ki-be diffundálhatnak az aktív zónából, vagyis nem találtak specifikus horgonyzó mechanizmust, amely potenciálisan a periszinaptikus zónában tarthatná őket [28]. Egy fontos kérdés tehát, hogy van-e az aktív zónához köthető mintázat a CB₁ receptorok eloszlásában, hiszen a CB₁ receptorok fiziológiai és patofiziológiai funkcióinak megértéséhez szükséges lenne ennek ismerete.

Eddig nem állt rendelkezésre olyan eljárás, amely sejt típus- és kompartment-specifikus módon alkalmas lenne adott célfehérjék mennyiségének és eloszlásának nanoskálájú precizitással történő mérésére, ám a szuperrezolúciós mikroszkópiás technológiák megjelenésével a CB₁ receptor eloszlásával kapcsolatban felmerülő kérdések megválaszolására is lehetőség nyílt.

3. 3. A szuperrezolúciós mikroszkópia lehetőségei a molekuláris neuroanatómiában

Az idegtudományok számára rendelkezésre álló kutatási eszközök drasztikusan gyarapodtak az utóbbi évtizedben. Az agyi génexpressziós atlaszok, a neuronális aktivitás monitorozására alkalmas genetikusan kódolt fehérjék és a hálózatok feltérképezésére is használható képalkotó eljárások hatalmas segítséget jelentenek [29].

A szinapszisok fehérjéinek vizsgálatában a klasszikus módszer az immunarany jelöléssel kiegészített elektronmikroszkópos képalkotás. Bár így nanométeres felbontású képhez juthatunk, melyen jelölés nélkül azonosíthatók a sejtalkotó, illetve szinaptikus struktúrák, a nagy áteresztő-képességű analízis nem megoldott a hosszadalmas minta-előkészítés, a nagy sűrűségű, illetve többszörös jelölés elérésének és a 3D rekonstrukciónak a nehézségei miatt. A képalkotáshoz elengedhetetlen a minták dehidrációja, mely anizotróp zsugorodást okoz, így hátráltatja a fehérjék pontos pozicionálását. Ezen kívül az elektronmikroszkópos technika a mérés és a minta-előkészítés körülményei miatt nem alkalmas komplex élő sejtek, szövetek vizsgálatára [30].

Ezzel szemben a fluoreszcens mikroszkópiás eljárások felhasználásával különböző fluorofórok segítségével többféle fehérje jelölhető egyszerre. Akár *in vivo* mérésekre is van lehetőség, valamint könnyebb elektrofiziológiai vizsgálatokkal kombinálni, így nagyobb kísérleti flexibilitást nyújt [31]. A klasszikus fluoreszcens mikroszkópiás technikák felbontása azonban jóval elmarad az elektronmikroszkópétól: 2-300 nm-es laterális és kb. 5-600 nm-es axiális irányban, ami nem elegendő a szinapszis fehérjéinek vizsgálatához, hiszen a különböző funkcionálisan eltérő domének, például az aktív zóna mérete is ebbe a tartományba esik. A fénymikroszkópok által elérhető legkisebb feloldható távolságot az Abbe-elv definiálja (2. ábra).

$$d = \frac{\lambda}{2n\sin\theta}$$

2. ábra Az Abbe-elv alapján definiált legkisebb feloldható távolság (d) [30]

Ahol λ a képalkotáshoz használt fény hullámhossza, n a közeg refraktív indexe, θ pedig az objektív félnyílásszöge. Az $n\sin\theta$ tagot az objektív numerikus apertúrájának nevezzük, mely egy nagyon jó objektív esetében a közeg törésmutatójához tart, ami üvegben 1,5 körüli érték. A látható fénnel végzett vizsgálatokhoz minimum körülbelül 400 nanométer hullámhosszú fényt tudunk felhasználni, így a fénymikroszkóp által legkisebb feloldható távolság elviekben sem lehet jobb 200-250 nanométernél.

A klasszikus fénymikroszkópokkal elérhető jel-zaj arány növelésére léteznek stratégiák. Az egyik ilyen például a képek, képsorozatok felvétel utáni dekonvolúciója. Pontszerű fényforrások leképeződésekor nem pontszerű kép, hanem a fény diffrakciója miatt egy nagyobb, Airy-korongnak nevezett mintázat keletkezik, ezen belül az intenzitás térbeli eloszlását pontválasz függvénynek hívják. Ez egyedi az adott képalkotási eljárásra, a mikroszkóp típusára és a képalkotás körülményeire nézve. A dekonvolúció a felvett képből próbálja visszafejteni a lehetséges eredeti struktúrát a mikroszkóp pontválasz függvényének ismeretében. Így jelentős kontrasztnövekedés és némi felbontás-növekedés is elérhető [32].

A konfokális pásztázó mikroszkóp úgy alkot képet, hogy fókuszált lézer fut végig a minta pontjain. Az elméleti fókuszon kívülről érkező fotonok kiszűrésére egy lyukdiafragmát alkalmaznak. A beérkező fotonokat foton sokszorozó cső (PMT) vagy lavina fotodióda (APD) segítségével erősítik fel, és alakítják elektromos jellé. A képalkotás végén egy kép vagy egy z-irányban felvett képsorozat keletkezik, mely pixelenként/voxelenként a minta kibocsátott fluoreszcenciájával arányos értékeket tartalmaz. A konfokális pásztázó mikroszkópiával nagyobb felbontásra tehetünk szert, mint a hagyományos széles látómezejű mikroszkópok esetében, de nem érhetjük el a diffrakció által meghatározott limitet [33, 34].

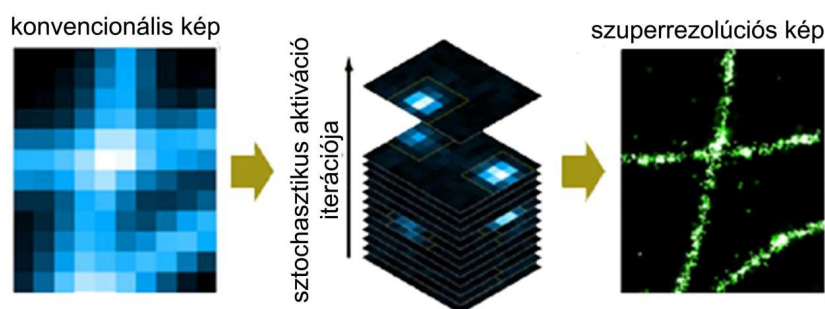
Az Abbe-elv által definiált diffrakciólimit megkerülésére a közelmúltban számos eszközt fejlesztettek, ezeket szuperrezolúciós eljárásoknak nevezzük. Strukturális megvilágításon alapszik a SIM (Structured Illumination Microscopy) és a STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), és egyedi molekula lokalizációt használ fel a PALM (Photoactivated Localization Microscopy) és a STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [35]. Tekintettel kutatásunk szempontjából előnyös tulajdonságaira, például az elérhető kitűnő lokalizációs precizitásra, a három dimenziós és többcsatornás képalkotásra való használhatóságra, a létező szuperrezolúciós módszerek közül mi a STORM mikroszkópiát választottuk a vizsgálatainkhoz, amely megítélésünk szerint a következő években értékes eszközzé válhat a molekuláris neuroanatómusok kezében.

3. 4. A STORM képalkotás

A lokalizációs mikroszkópia azt használja ki, hogy az egyedi fluorofórok helyzete nagyon pontosan meghatározható. A képalkotás során az egyedi lokalizációt az teszi lehetővé, hogy a fluorofóroknak egyszerre csak egy kicsi, véletlenszerű halmaza világít. Ehhez szükséges a „photoswitching” mechanizmus, miszerint egyes fluorofórok nagy intenzitású lézertér hatására reverzibilis módon egy nem gerjeszthető állapotba vihetők („sötét állapot”), majd rövidebb hullámhosszú fény segítségével ismét gerjeszthető állapotba kapcsolhatók.

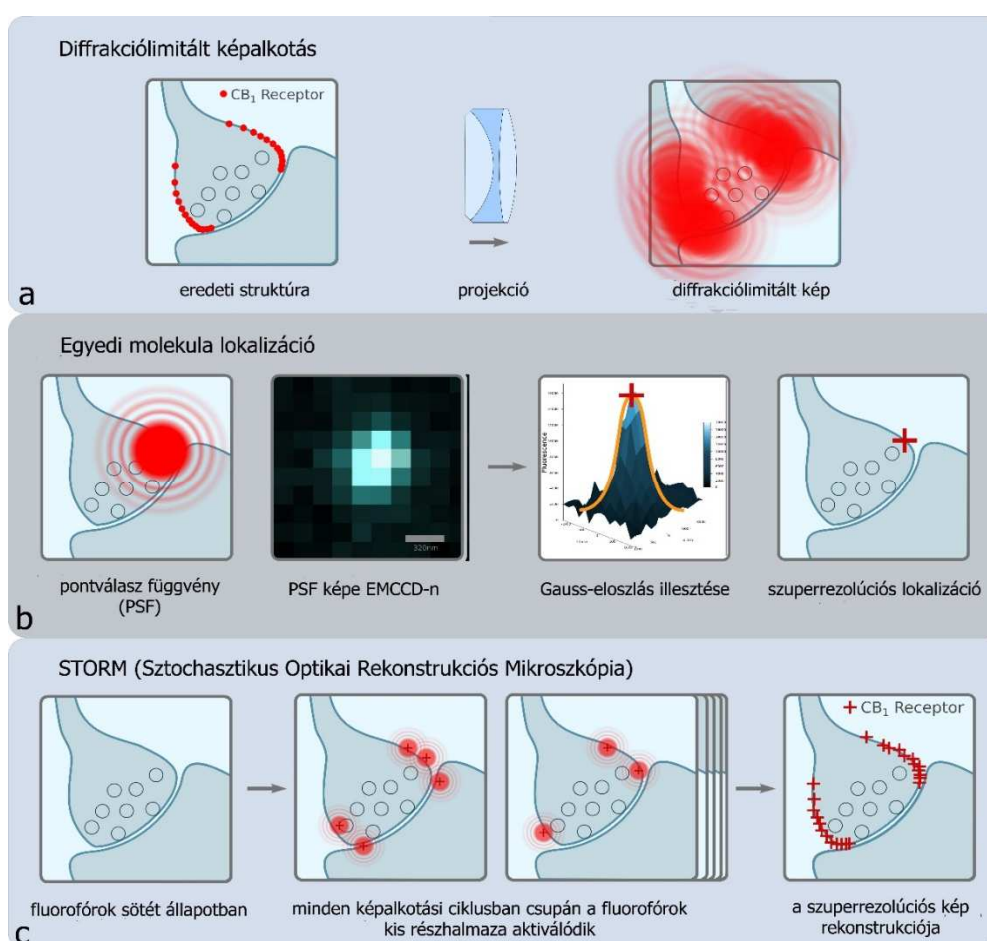
Egy egyedi fluorofór felvillanás helye önmagában nagy pontossággal detektálható, ha elegendő fotont tudunk összegyűjteni, és az egyes felvillanások kellően távol vannak egymástól. Így ha a fluorofórok közül megfelelő hullámhosszú és intenzitású fénnel sikerül egyszerre viszonylag kevés számút felvillantani és megfigyelni, majd sötét állapotba vinni őket, ezen folyamat sorozatos alkalmazásával akár néhány nm-es laterális és 30-40 nm-es axiális felbontás is elérhető. Ez jelentősen jobb teljesítmény, mint amire a hagyományos fluoreszcens képalkotás képes, és eléri az immunarany elektronmikroszkópia lokalizációs pontosságát [36, 37] (3. ábra).

A módszer jól felhasználható az endokannabinoid rendszer molekuláris alkotóelemeinek tanulmányozása során, például a CB₁ kannabinoid receptorok vizsgálatához is (4. ábra).



3. ábra A STORM képalkotás [35]

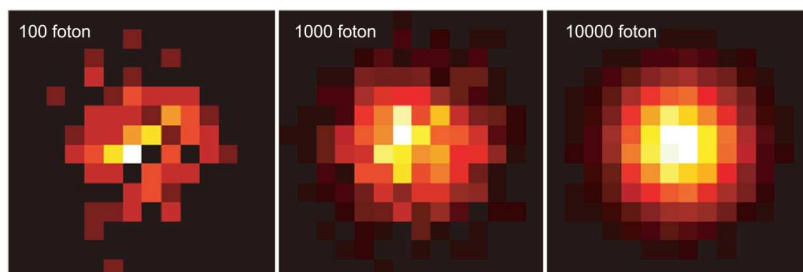
A kép bal oldalán kb. 25 nm átmérőjű mikrotubulusokról konvencionális diffrakciólimitált képalkotással készült kép látható, melyen alig kivehető azok szálak szerkezete. De ha egy-egy fluorofórt egymástól elkülönítve lokalizálunk több ciklusban a STORM mikroszkópia segítségével (középen), akkor sokkal jobb felbontású, részletgazdagabb képet kapunk (jobb oldal). (ábra: Huang és mtsai., módosítva)



4. ábra A STORM szuperrezolúciós mikroszkópia működésének elvi alapjai a CB₁ receptor példáján bemutattva

Ahhoz, hogy megkerüljük a diffrakciós limitet, és nagy felbontású információt kapjunk az endokannabinoid rendszer tagjairól, például az axonvégződéseken elhelyezkedő CB₁ receptorokról, a hozzájuk immunreakcióval kapcsolt fluorofórokat kis intenzitású lézerfényvel aktiváljuk, így csupán a fluorofórok egy kis csoportját villantjuk fel, sztochasztikus módon, ezzel elkerülhetjük a pontszerű fényforrások leképeződése során létrejövő fénykorongok átfedését. Egy-egy ilyen korong középpontja viszonylag könnyen és pontosan kiszámolható. Az EMCCD képen egy megfelelő Gauss-eloszlás illesztésével meghatározható egy-egy lokalizáció, melynek pontossága többek közt a begyűjtött fotonok számától függ. A detekciós folyamat nagyszámú ismétlésével rekonstruálható a receptoreloszlásról a kívánt kép. (ábra: Barna László)

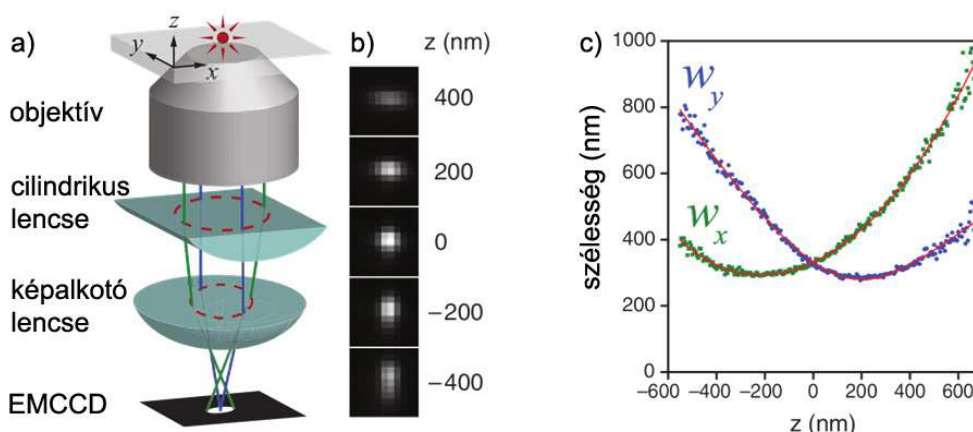
Az egyes fluorofórok helyének meghatározásának pontosságát a lokalizációs precizitással lehet jellemezni. Ez annál nagyobb, minél több fotont képes detektálni a rendszer egy felvillanásból (5. ábra).



5. ábra A STORM jel lokalizációs precizitásának függése a detektált fotonok számától [38]

Minél több fotont gyűjtünk be egy-egy fluorofór felvillanásából, annál nagyobb lesz a jel/zaj arány, és annál pontosabban illeszthető rá Gauss-eloszlás, amelynek pontosabban meghatározható a várható értéke. Az illesztett függvény félértékszélességét jellemzi a lokalizációs precizitás nevű mérőszám. Az ábrán balról jobbra haladva nő a detektálható fotonok száma és a pontokat jellemző lokalizációs precizitás. (ábra: McEvoy és mtsai., módosítva)

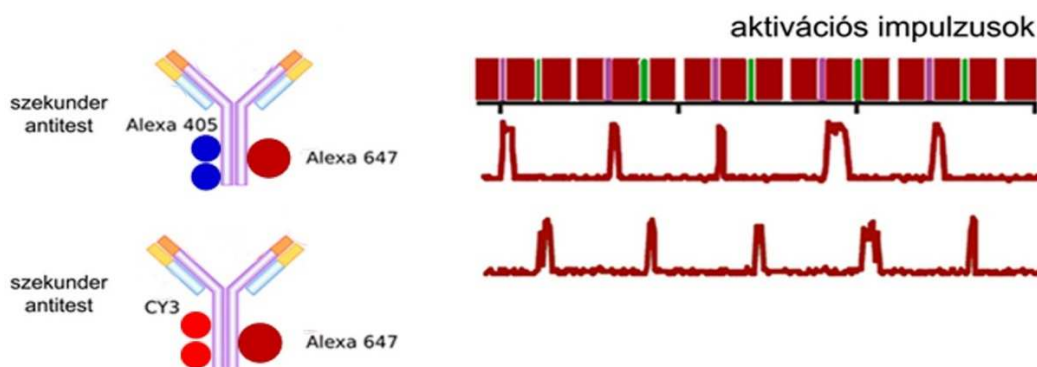
A STORM képalkotás nem csupán egy síkban, hanem három dimenzióban is képes a diffrakciós limitet meghaladó pontossággal meghatározni a felvillanások helyzetét. Ehhez egy cilindrikus lencse behelyezésére van szükség, amely az x vagy y tengely mentén elnyújtja a felvillanások képét attól függően, hogy a fluorofór az optikai sík alatt vagy fölött helyezkedik el, így különböző irányban álló, a z-pozícióval arányosan torzult ellipsziseket kapunk. Egy kalibrációs görbe segítségével lehetőség nyílik az eredeti mélység adat visszafejtésére. A képalkotás z-irányú lokalizációs precizitása így kb. 50 nm [39] (6. ábra).



6. ábra 3D STORM képalkotás [39]

- A három dimenziós STORM képalkotáshoz egy cilindrikus lencse behelyezése szükséges az objektív és a képalkotó lencse közé.
- A cilindrikus lencse az optikai síktól való távolság függvényében megváltoztatja a pontok képének ellipticitását.
- Egy fluorofórokat egyetlen síkban tartalmazó minta z-irányú mozgatásával felvett kalibrációs görbe segítségével az ellipszisek alakjából meghatározható a felvillanások z-irányú pozíciója. (ábra: Huang és mtsai., módosítva)

A STORM mikroszkópiához a módszer szempontjából előnyös tulajdonságokkal (kibocsátott fotonszám, gerjeszthetőségi tartomány) rendelkező fluorofórok [40, 41], illetve a képalkotási körülmények optimalizálásához speciális puffer szükséges [31]. A fluorofórok megfelelő kombinálásával pedig többcsatornás képalkotás is elérhető, így akár több különböző fehérje egyidejű szuperrezolúciós vizsgálata is megoldható [42] (7. ábra).



7. ábra Többcsatornás STORM képalkotás [42]

A többcsatornás STORM képek készítéséhez a vizsgálandó fehérjéket olyan szekunder antitestekkel szükséges jelölni, amelyeken eltérőek az aktivátor fluorofórok (az ábra bal oldalán Alexa 405 és CY3), így eltérő hullámhosszú kis intenzitású fénnel aktiválhatók, de ugyanakkor egyforma riporter fluorofórral (itt Alexa 647) rendelkeznek. A képalkotás úgy zajlik, hogy az aktivátor lézerek felváltva működnek, így a fluorofórok felvillanásának időpontjából következtethetünk arra, hogy mely csatornához tartoznak. (ábra: Bates és mtsai., módosítva)

3. 5. Vizualizációs és analízis eszközök STORM szuperrezolúciós mikroszkópiához

A nagy felbontású lokalizációs mikroszkópos technikák hatékonyságát sokszor limitálja a célfehérjék molekuláris eloszlásának tanulmányozása során, hogy az így készült képeket nehéz kontextusba helyezni, hiszen például a STORM képeken nem látszanak a sejtmembrán, illetve a sejtalkotók, a szubcelluláris kompartmentek határai. Ezen kívül, ha több sejt vagy sejttípus is kifejezi a vizsgált fehérjét, akkor ezek között önmagukban nem tudunk különbséget tenni. Bár azonosítatlan szinapszispopulációban történtek vizsgálatok egyes szinaptikus fehérjék elhelyezkedésének meghatározására szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével [31], sejttípus-, sejt-, illetve szubcelluláris kompartment-specifikus analízisre eddig nem volt technikai lehetőség.

A konfokális mikroszkópia lehetőséget nyújt egyedi sejtek elkülönítésére, illetve segít szubcelluláris kontextusba helyezni a STORM lokalizációs pontokat, így a szuperrezolúciós

adatokkal kombinálva értékes eszköz lehet a jelölt célfehérjék sejttípus- és kompartmentspecifikus vizsgálata során.

Mindkét adattípus kezelésére külön-külön fejlett eszközök állnak rendelkezésre, ezek egy része a mikroszkópgyártók saját szoftvere, amellyel a mikroszkópok részei és a képalkotás folyamata irányíthatóak, de az adatok elemzésére korlátozottan használhatók fel. Ilyen pl. az általunk a képalkotás és adatfeldolgozás során használt NIKON NIS Elements szoftver. Ezen kívül a lokalizációs mikroszkópos nyers képek feldolgozásához szabadon elérhető programok és algoritmusok széles skálája kínálkozik (pl. RapidSTORM [43], QuickPALM [44]), és ezek általában alapszintű megjelenítési eszközökkel is rendelkeznek. Azonban a szuperrezolúciós adatokon végzett speciális analíziseszközök tárháza egyelőre korlátozott. A hagyományos pixelintenzitású mikroszkópos képek megjelenítésére és analízisére fejlett eszközök állnak rendelkezésre a szabadon elérhető szoftverek között is, ilyen például a széles körben használt ImageJ.

A STORM és konfokális jelek korrelált vizualizációjára és elemzésére viszont eddig nem nyílt lehetőség egyetlen programcsomagban sem, pedig a STORM adatok sejttípus- és kompartmentspecifikus analíziséhez szükség volna ilyen eszközre.

3. 6. Célkitűzés

Tudományos diákköri munkámnak kettős célja volt:

a) A STORM adatok vizualizációját és elemzését segítő szoftver fejlesztése, amely alkalmas STORM és konfokális adatok egyidejű kezelésére, pontos megjelenítésére, tartalmaz a STORM képek analíziséhez szükséges eszközöket. Céлом volt, hogy megoldható legyen vele egy bizonyos adatpont-csoport kijelölése, akár a konfokális képhez illeszkedő módon, alkalmas legyen 3D-vizualizációra és a mélységi koordináták kezelésére, nagyobb elemszámú kísérletek hatékony feldolgozására, valamint könnyen kezelhető grafikus felhasználói felülettel rendelkezzen.

b) Második feladatomban volt, hogy az általam fejlesztett eszközök felhasználásával megvizsgáljam a CB₁ receptor eloszlását a hippocampus GABA-erg axonterminálisain belül, többek közt választ keressek olyan kérdésekre, mint hogy függ-e a receptorok száma az axonvégződés méretétől, vagy van-e domén-specifikus receptorsűrűség-változás az aktív zónában.

4. Anyag és módszer

4. 1. Perfúzió és metszetek készítése

Az állatkísérleteket a Magyar Állatorvosi Kamara Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: XIV-1-001/2332-4/2012), és az Állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. (XII. 31.) kormányrendeletnek megfelelő módon zajlottak. A legkisebb szükséges számú állatot áldoztuk fel, és törekedtünk a fájdalmuk minimalizálására. Felnőtt hím vad típusú C57BL/6 egerek (n=3) intraperitoneális avertin injekcióval történő túlaltatása után traszkardiális perfúzió következett először 0.9%-os fiziológiás sóoldattal, majd 0.1 M-os foszfát-pufferben (PB, pH 7.4) oldott 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal 20 percig. A perfúzió után az agyat eltávolítottuk a koponyából, és 2 óráig 4%-os paraformaldehid oldatban posztfixáltuk. Ezután először 500 µm vastag koronális szeleteket készítettünk egy Leica (Nussloch, Németország) VT-1000S típusú vibratóm segítségével, majd 2%-os agarózba ágyazva újraszzeleteltük PB-ben, hogy a STORM képalkotáshoz ideális 20 µm-es vastagságot elérjük.

4. 2. Immunfestés

A szeleteket 24-lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük, majd az immunfestést szabadon úszó módon végeztük. TBS pufferben történő mosás után TBS-ben oldott 1%-os humán szérum albuminnal (Sigma) történt az aspecifikus kötőhelyek blokkolása, és 0.3%-os Triton oldatban a szeletek permeabilizálása az antitest-penetráció elősegítése érdekében. Az elsődleges antitesteket a következő koncentrációban használtuk TBS-ben: tengerimalac anti-CB₁ [45] 1:000, nyúl anti-neurologin-2 1:1000 (Synaptic Systems), majd egy éjszakán keresztül inkubáltuk folyamatos rázatás közben. TBS-ben való mosás után 2 óráig inkubáltuk a szeleteket a másodlagos antitestekkel: anti-tengerimalac Alexa-488-konjugált szekunder (Jackson) 1:400 koncentrációban, anti-nyúl Alexa-647-konjugált szekunder (Jackson) 1:400 koncentrációban. TBS-ben, illetve PB-ben való mosás után a szeleteket acetonnal megtisztított #1.5 boroszilikát fedőlemezekre raktuk ki és szárítottuk rá, majd a képalkotásig 4°C-on tároltuk. Közvetlenül a STORM képalkotás előtt speciális, a STORM képalkotásra optimalizált pufferbe [31] helyeztük a szeleteket, és tárgylemezekre raktuk. Az oldat 5% glukózt, 0.1 M merkaptotilamint, 1 mg/ml glukóz-oxidázt és katalázt (2.5 µl/ml vizes oldat a Sigmától, kb. 1500 U/ml végkoncentrációval) tartalmazott Dulbecco-féle PBS-ben oldva

(Sigma). A fedőlemezeket körömlakkal erősítettük a tárgylemezhez, majd 10 perc elteltével elkezdődött a képalkotás, amely egy minta lefedése után nem tartott tovább egyik esetben sem szeletenként 3 óránál.

4. 3. Kombinált konfokális/STORM képalkotás

A STORM és konfokális képsorozatok elkészítéséhez CFI Apo TIRF 100x objektívet (NA: 1.49) és Nikon N-STORM rendszerrel, C2 konfokális szkennereffejel, valamint Andor iXon Ultra 897 EMCCD kamerával ellátott Nikon Ti-E invertált mikroszkópot használtunk. A 3D-STORM vizsgálatokat cilindrikus lencse behelyezése biztosította [39]. A képalkotást N-STORM modullal kiegészített Nikon NIS-Elements AR szoftver irányította. A STORM képalkotáshoz egy 300 mW-os lézert (VFL-P-300-647, MPB Communications, Montreal, Kanada) használtunk. A megfelelő vizsgálni kívánt terület kiválasztását az élő EMCCD képen 488 nm-es megvilágítás során keletkezett kép segítette.

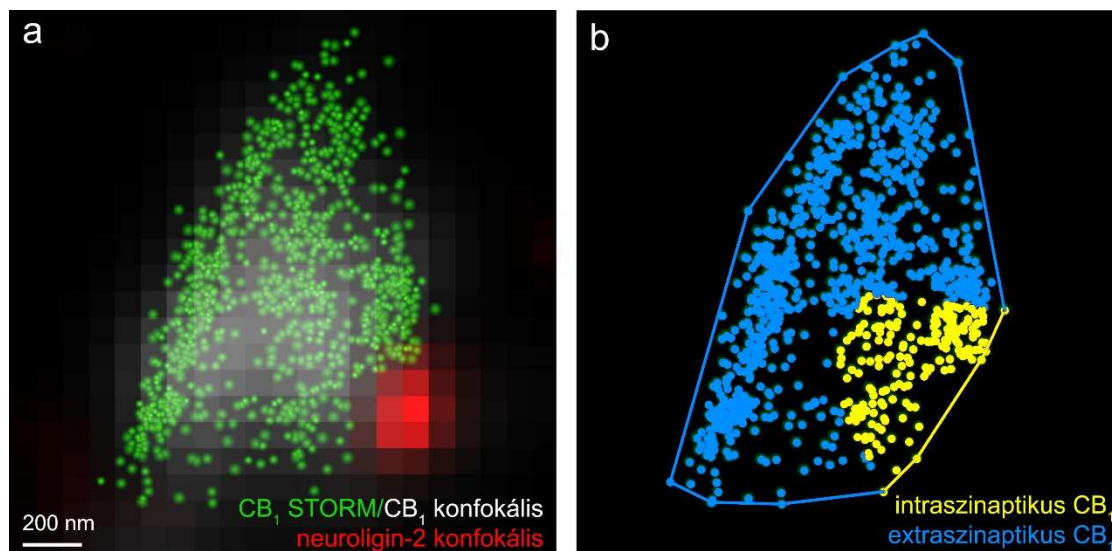
A konfokális képsorozat (512x512x15 pixel, 78x78x150 nm felbontás) előállításához 488 nm-es és 647 nm-es gerjesztést használtunk. A STORM képalkotáshoz DUAL filterkockára (Nikon) és az EMCCD-re volt szükség. Ennek során kis intenzitású 405 nm-es aktivátor és nagy intenzitású 647 nm-es riporter megvilágítást alkalmaztunk képenként összesen 4000 képkockán keresztül. Az alacsony intenzitású aktivációra azért volt szükség, hogy biztosítsuk, hogy egyszerre a fluorofóroknak csak kis, még elkülöníthető hányada villanjon fel. Annak érdekében, hogy minimalizáljuk a nem fókuszba eső háttérrel, ferde megvilágítást alkalmaztunk a mikroszkóp TIRF világítóeszközének segítségével. A fókusz stabilitását a kísérlet során a PFS (Perfect Focus System) biztosította. Az antitest-penetráció különbözőségeiből adódó hibák minimalizálása érdekében a különböző szeletekben hasonló mélységben gyűjtöttük a lokalizációs pontokat, illetve a fókuszsíktól -300-tól +300 nm-ig terjedő zónába eső pontokat vettük csak figyelembe, hogy a fényszóródásból adódó eltéréseket kiküszöböljük.

4. 4. Kombinált konfokális/STORM képfeldolgozás

A konfokális képsorozatokon klasszikus maximum likelihood becselő dekonvolváló algoritmust futtattunk 40 iterációval a Huygens szoftver (SVI, Hollandia) segítségével, ehhez elméleti pontválasz függvényt (PSF) használtunk. A STORM mikroszkópiával nyert képeken a NIS-Elements AR szoftver STORM modulja segítségével futtattunk analízist annak érdekében, hogy megkapjuk a lokalizációs pontok koordinátáit. A lokalizációk hatékonyabb megtalálását az átfedő csúcsok kiszűrését végző 3D-DAOSTORM algoritmus segítette [46]. Minden képre azonos beállításokat alkalmaztunk. A közel kétszáz kép hatékony elemzését Python és AutoHotkey szkriptek segítségével oldottuk meg.

4. 5. Intraszinaptikus - extraszinaptikus sűrűséganalízis

Az analízis további részei teljes egészében az új, általam fejlesztett szoftver segítségével készültek el. A konfokális képsorozatból kiválasztottuk azt, amelynek a síkjában történt a STORM képalkotás, majd a konfokális kép alapján kerestünk a látótérben egy olyan axonvégződést, amellyel szemben, a posztszinaptikus oldalon a neuroligin-2 jel meggyőző mennyiségben van jelen, és a jelzett szinapszis a bouton oldalán helyezkedik el, nem pedig a bouton síkja fölött. Ezután szükséges volt a STORM és konfokális képek manuális illesztése, hiszen nem ugyanaz a kamera regisztrálta őket, így nem volt tökéletes az átfedés. A CB₁ jel sűrűségének köszönhetően ez nagy pontossággal megvalósítható volt. Ezután szabadkézi körberajzolás segítségével megállapítottuk a boutonhoz tartozó CB₁ lokalizációs pontokat, és elmentettük azokat. A CB₁ jel alapján a bouton szélét jelölő konvex burkolón a neuroligin-2 jel elhelyezkedése alapján kijelöltük azt a két csúcsot, amely a szinapszist feltételezetten határolja, és a közéjük eső kerületszakaszt szinaptikusnak, a rajtuk kívül eső szakaszt pedig extraszinaptikusnak tekintettük. Ezután kiszámoltuk minden lokalizációs pont távolságát az intraszinaptikus, illetve az extraszinaptikus konvex burkolódaraboktól, és ezek minimumát véve kialakítottunk egy intraszinaptikus és egy extraszinaptikus CB₁ adathalmazt. Ezek koordinátáit szintén külön tároltuk (8. ábra). A sűrűségeket a lokalizációs pontok számának és a burkolódarab hosszának hányadosával definiáltuk. A hippocampusz CA1 régiójának piramistrétegében található boutonokat (n=41) vettünk be a vizsgálatba, ezek összesen három állatból származtak.



8. ábra Szinapszis helyének kijelölése neurologin-2 konfokális kép segítségével

a) Hippokampális CA1 interneuron axonvégződésének anti- CB_1 STORM képe (zöld), és ráillesztve az anti- CB_1 (fehér) és anti-neurologin-2 (piros) festés konfokális képe. A szinapszis helyét a neurologin-2 jel helyzete jelöli.
 b) Ugyanazon axonvégződésen a CB_1 lokalizációra illesztettünk egy konvex burkolót, és a szinapszis határának kijelölése után kiszámoltuk a lokalizációknak az egyes kerületdaraboktól való távolságát, majd ez alapján intraszinaptikus vagy extraszinaptikus receptornak jelöltük őket.

4. 6. Statisztikai analízis és ábrakészítés

A statisztikai analízist STATISTICA 12 szoftver segítségével végeztük (StatSoft, Tulsa, OK). Az adatok normalitásvizsgálata Kolmogorov–Smirnov teszttel történt. Mivel nem voltak normális eloszlásúak a mintáink, ezért nemparaméteres tesztek alkalmaztunk a továbbiakban. Az egyes állatokból származó boutonok adatainak egyesítése nem szignifikáns Kruskal–Wallis teszt után történt meg (bouton terület: $p=0.7402$, bouton CB_1 szám: $p=0.3732$, intraszinaptikus sűrűség: $p=0.6334$, extraszinaptikus sűrűség: $p=0.068$). A bouton terület és a CB_1 lokalizációk számának összehasonlításához Spearman-féle rang korrelációt, az intraszinaptikus és az extraszinaptikus sűrűségek összehasonlításához előjel-tesztet használtunk.

Az ábrákat Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA) segítségével készítettük.

4. 7. A korrelációs szoftverben használt speciális algoritmusok

4. 7. 1. Aktív kontúr

Az aktív kontúr algoritmust abból a célból alkalmaztuk, hogy objektívabbá és hatékonyabbá tegyük a korrelált konfokális és STORM képeken az egyedileg jelölt struktúrákhoz (esetünkben az egy axonvégződéshez) tartozó STORM lokalizációs pontok kiválasztását. Ez egy olyan módszer, amely „külső” és „belső” energiákat rendel egy-egy kontúr állapothoz, és ezek összegét próbálja minimalizálni (9. ábra). A külső energia akkor minimális, ha a rajzolt kontúr egybeesik a valódi határ pozícióval, tehát ahol például nagy gradiens figyelhető meg a képen. A belső energia pedig akkor minimális, ha a rajzolt kontúr minél inkább reguláris, sima formájú [47].

$$v_i = (x_i, y_i), \quad \text{ahol } i = 0 \dots n - 1$$

$$E_{AK}^* = \int_0^1 E_{AK}(v(s)) ds = \int_0^1 (E_{belső}(v(s)) + E_{külső}(v(s))) ds$$

$$E_{külső}(v(s)) = E_{kép}(v(s)) + E_{kényszer}(v(s))$$

9. ábra Az aktív kontúr módszer alapegyenletei [47]

Az aktív kontúr módszer alapja, hogy adott egy n pontból álló koordinátahalmaz (v), amelyet az algoritmus elején a kiválasztandó struktúra körül definiálunk. Ezután a halmaz mozgását "külső" és "belső" energiák irányítják, melynek során az alakzat az energiaminimumra törekszik, ennek megfelelően helyezkedik el a végső állapotában. A "belső" energia a koordinátahalmaz alakjával van összefüggésben: minél regulárisabb, simább az alakzat, annál alacsonyabb a belső energia. A "külső" energia két komponensből tevődik össze, az egyik a kép tulajdonságaiból adódik, a másik kívülről, a felhasználó által meghatározott kényszer lehet. A "külső" energia akkor minimális, minél inkább egy kiugró élen helyezkedik az alakzat, illetve minél jobban megfelel a megadott kényszerfeltételeknek.

A Python-implementációk közül a MACWE (Morphological Active Contours Without Edges, élmentes morfológiai aktív kontúrok) módszert választottuk (10. ábra), mert kevés, ám a képek változó minőségéhez rugalmasan alkalmazkodó paramétert használ. Így a hagyományos küszöb alapú élkereső algoritmusoknál jobban igazodik a biológiai minták sokféleségéhez, valamint a topológiát is figyelembe veszi, így zajos képeken alkalmazva is "sima" alakzatokat kapunk [48].

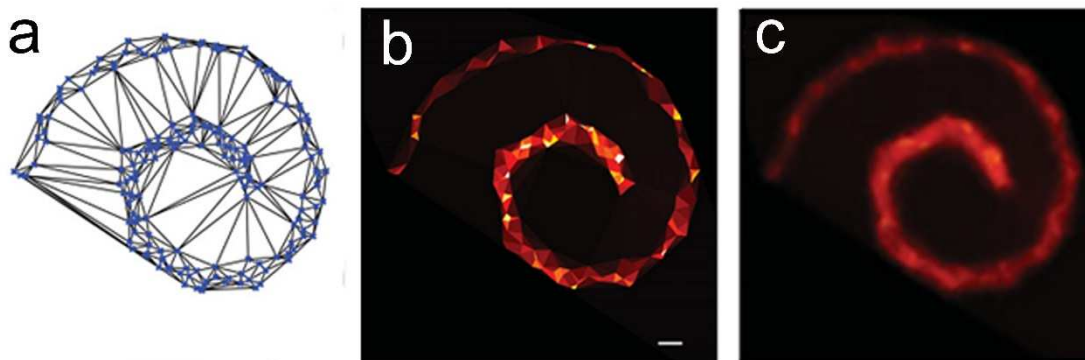
$$\begin{aligned}
F(c_1, c_2, C) = & \mu * hossz(C) + \nu * terület(belül(C)) \\
& + \lambda_1 \int_{belül(C)} \|I(x) - c_1\| dx \\
& + \lambda_2 \int_{kívül(C)} \|I(x) - c_2\| dx
\end{aligned}$$

10. ábra Az élmentes morfológiai aktív kontúrok (MACWE) módszer alapegyenlete [48]

Ahol F egy C görbe funkcionálja, ezen funkcionál minimalizálására törekszik a módszer. $I(x)$ jelzi a képmátrix helyfüggését, c_1 és c_2 konstansok. A $belül(C)$ és a $kívül(C)$ a kép görbén belüli és kívüli területeit definiálják, $terület(belül(C))$ a görbén belüli terület mérőszáma, $hossz(C)$ a görbe hossza. μ , ν , λ_1 és λ_2 nem negatív paraméterek, és az egyes kifejezések erősségét modulálják. A μ paraméter a görbe simítását szabályozza. Ha kis struktúrákat keresünk a képen, akkor kicsinek kell lennie az értékének (pl. 1), ha pedig nagyobbakat, akkor ennél nagyobboknak. λ_1 és λ_2 egymáshoz képest felvett értékének beállításával lehet szabályozni, hogy a görbén belüli vagy kívüli pixelek értékei számítsanak hangsúlyosabbnak. Az általunk végzett tesztekben $\lambda_1 = \lambda_2 = 1$ értéket használtunk.

4. 7. 2. Alternatív eszközök STORM koordináták megjelenítésére

Egy nemrégiben megjelent tanulmány [49] szerint a legtöbb lokalizációs mikroszkópiai adatot megjelenítő szoftver által használt módszer, amely eltérő félértékszélességű Gauss-eloszlásokkal jeleníti meg az eltérő lokalizációs precizitású pontokat, nem veszi figyelembe kellőképpen a mintavételezés tulajdonságait. Ezért akár másfélszeres felbontáscsökkenést is eredményezhet a lokalizációs pontokat nagy sűrűségben tartalmazó területeken, míg a rosszul mintavételezett részekben az immunfestés háttérét képező pontokat is a vizsgált struktúra részeiként értelmezhetjük. Erre a problémára nyújthat megoldást a Delaunay-háromszögelésen nyugvó megjelenítés, mely azon alapul, hogy 3-3 lokalizációs pont köré úgy rajzolunk körülírt köröket, hogy ezekbe a körökbe ne essen bele semelyik negyedek pont. Az így kapott ponthármak lesznek a háromszögek csúcsai. A módszer úgy építi be az egyes pontok mintavételezési sűrűségét, hogy a koordinátáikra egy azzal arányos véletlen Gauss-eloszlású zajt tesz, és többszöri iteráció után a kapott képek átlagát veszi. Ez elnyomja az alul-mintavételezett területeken a hamis struktúrák megjelenését, viszont megakadályozza a felbontáscsökkenést a jól mintavételezett területeken. Így hagyományos mikroszkópos kép hatású struktúra nyerhető (11. ábra) [49].



11. ábra Egyszerű spirál Delaunay-háromszögeléssel nyert képe [49]

- a) Egyszerű spirál pontjainak helyzete és a számolt háromszögelés.
 b) A háromszögeléssel nyert megjelenített kép. A színekódolás a háromszögek mérete alapján történt.
 c) 40 kép átlaga, amelyet úgy nyertek, hogy a koordinátákat a jelsűrűséggel arányosan véletlenszerűen áthelyezték. (ábra: Baddeley és mtsai, módosítva)

A Delaunay-háromszögelés jobban megőrzi a mintavételezés tulajdonságait, és jobban értelmezhető képet nyújt a struktúrákról, így a hagyományos Gauss-alapú megjelenítés mellé ezt is beépítettük az általunk készített szoftverbe.

Az eredeti publikáció a háromszögek területe alapján színezte a struktúrákat: minél kisebbek voltak a háromszögek, annál világosabbak voltak, ám a mi céljainknak ez nem volt megfelelő, mert a nagyon elnyúlt, de kis területű háromszögek kiemelkedtek, így inkább a háromszögek leghosszabb oldalát használtuk fel a színezés alapjaként, így a megfelelő struktúrákat sikerült helyesen ábrázolnunk.

5. Eredmények és értékelésük

5. 1. A korrelációs szoftver funkcióinak bemutatása

A szoftver megtervezése során igyekeztünk a molekuláris neuroanatómiai megfontolásoknak eleget tenni, és minél inkább támogatni a kutatócsoportunkban a rendszeres mikroszkópos munka és adatfeldolgozás során felmerült igényeket, lehetséges funkciókat.

A szoftver alapjául a Python programnyelvre esett a választás, mert így rugalmas fejlesztésre nyílik lehetőség, és a széles körben való ismertség miatt akár más kutatócsoportok is használhatják, továbbfejleszthetik majd az általunk kidolgozott módszereket. A Python egy általános célú, nagyon magas szintű programozási nyelv. Interpreteres, a megírt kód rögtön futtatható. Támogat többféle programozási paradigmát, dinamikus típusokat és automatikus memóriakezelést használ. Előnye, hogy jól átlátható kódot lehet vele generálni. Számtalan szabadon elérhető és használható könyvtárat fejlesztettek hozzá 1991-es megjelenése óta, így feladatok széles körének megoldására alkalmazható. Hátránya, hogy nem sebességre van optimalizálva, prototípus fejlesztésre viszont ideális.

A programmal kapcsolatban a következők voltak az alapvető követelményeink:

- A szuperrezolúciós képalkotás során használt Nis-Elements (Nikon) szoftver kimeneteként kapott szöveges fájlt használja a STORM adatok megjelenítéséhez, illetve be tudjon olvasni konfokális képalkotási eljárással készült képet és képsorozatot is, ezeket egyidejűleg meg tudja jeleníteni, egymáshoz tudja illeszteni.
- A vizualizáció hasonló legyen a Nis-Elements szoftver általi megjelenítéshez, képes legyen egy adott pont lokalizációs precizitását különböző félértékszélességű Gauss-eloszlásokkal jelölni.
- A pontok z-irányú helyzetét két dimenzióban színezéssel jelenítse meg, de lehetőség legyen három dimenziós vizualizációra is.
- Könnyen kezelhető grafikus felhasználói felület tartozzon hozzá.

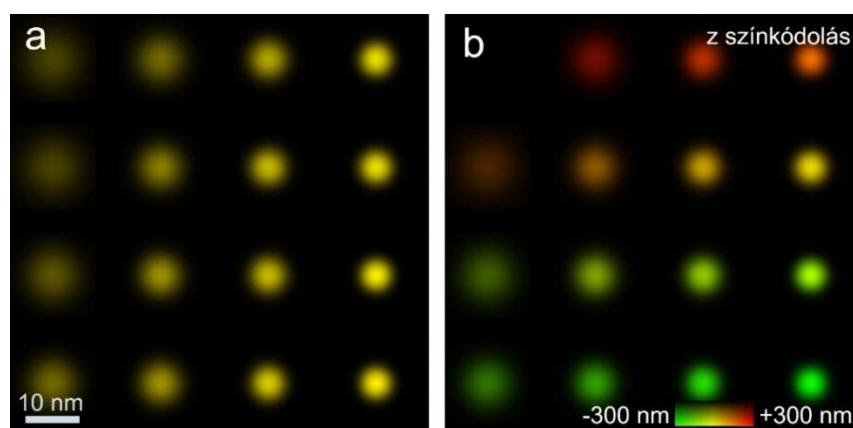
Felmerült az igény több egymás feletti síkban felvett STORM adatcsoport illesztésére, illetve lokalizációs pontok körülhatárolt halmazának szabadkézi, valamint automatikus szegmentációval történő kijelölésére és elkülönítésére és nagy mennyiségű minta automatizált

feldolgozására is, valamint kísérleteztünk a lokalizációs mikroszkópiával kapott koordináták konvencionális képként való megjelenítésével is.

Ettől a szakasztól kezdve minden kép a saját készítésű szoftverünk segítségével készült, és a következő példákon keresztül szeretnénk bemutatni az implementált funkciókat.

5. 1. 1. A STORM koordináták megjelenítése

Mivel a STORM mikroszkópiával nyert adat tulajdonképpen a lokalizációs pontok koordinátáinak halmaza, ezért pontokkal vagy különböző félértékszélességű Gauss-eloszlású felhőkkel ábrázolhatóak a lokalizációs precizitásuk függvényében. A pontok színezhetők a detektált csatornák szerint vagy a z-koordinátákat is reprezentálhatják (12. ábra).



12. ábra STORM koordináta reprezentáció a korrelációs szoftver segítségével

A) Különböző lokalizációs precizitású pontok vizualizációja. Nagyobb lokalizációs precizitású ponthoz kisebb félértékszélességű, fényesebb Gauss-eloszlás tartozik.

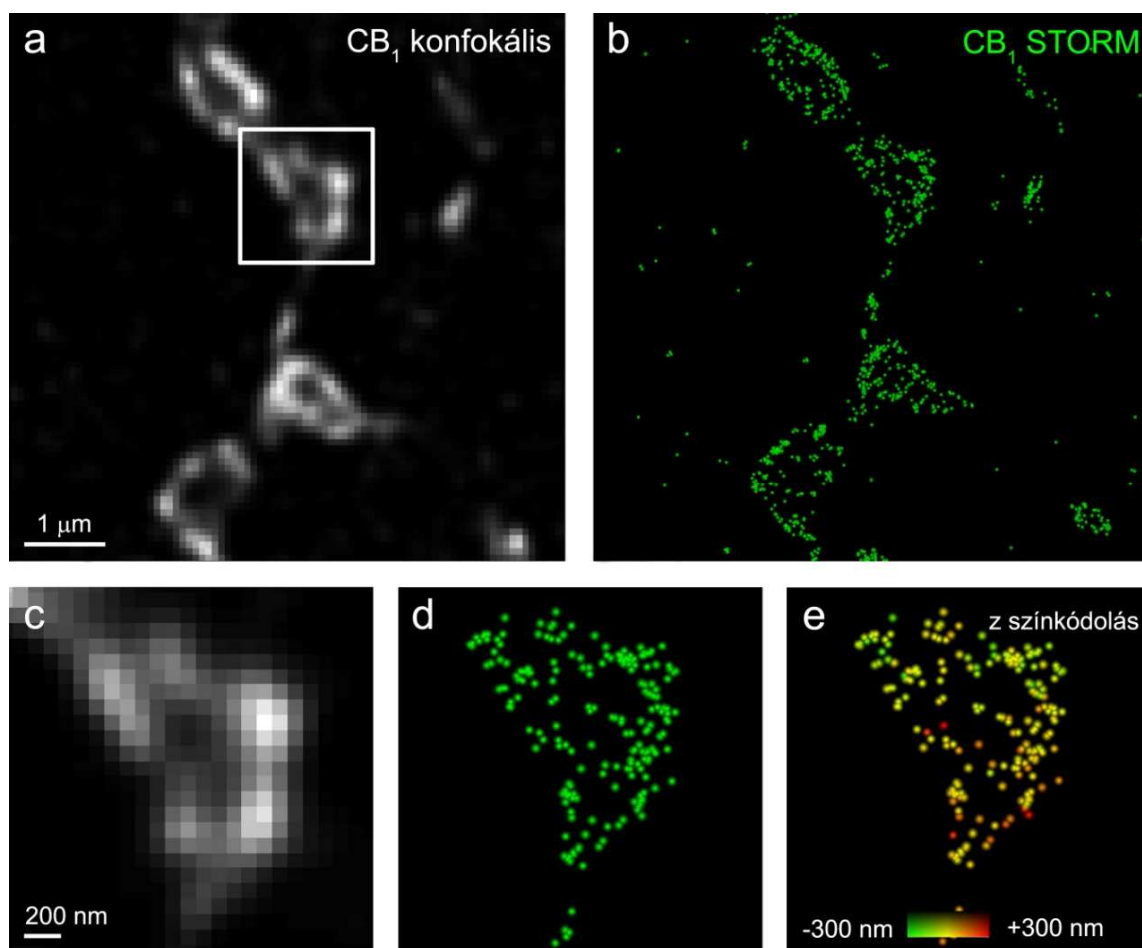
b) Különböző z-koordinátájú pontok megjelenítése két dimenzióban szinkódolás segítségével.

5. 1. 2. Konfokális és STORM adatok korrelált megjelenítése

Mivel a STORM adatok nem teszik lehetővé a sejtmembrán, illetve a sejtalkotók határainak megjelenítését, valamint egyszeres festés esetén nincs lehetőség annak eldöntésére sem, hogy milyen sejtípust vizsgálunk, szükséges a STORM adatok celluláris kontextusba való helyezése egy másik típusú képalkotási technika segítségével. Ehhez megfelelő módszernek kínálkozott a konfokális mikroszkópiával való kombináció, hiszen akár többszörös immunfestés konfokális képének segítségével meghatározhatók az egyes sejtek határai, láttathatóak egyes sejtípus specifikus markerek, valamint sejtfeltöltés segítségével akár egyedi sejtek is vizsgálhatóak. Ehhez viszont szükség van a hagyományos pixelintenzitás alapú konfokális képek és a koordináta alapú STORM adatok együttes megjelenítésére és

analízisére, ami viszont eddig egyetlen szoftverben sem volt elérhető. Ezen problémára kínál megoldást az általunk fejlesztett program.

A 13. ábrán a hippocampusz piramisrétegének területén anti-CB₁ immunfestés képe látható dekonvolvált konfokális, illetve STORM mikroszkópiás megjelenítéssel. Megfigyelhető a STORM mikroszkópia nagyobb felbontóképessége a diffrakció-limitált konfokális képalkotással szemben, hiszen a jelölt fehérjékhez tartozó fluorofórok elkülönülnek egymástól. A CB₁ festés sűrűsége megengedte azt, hogy a nagyobb struktúrák (itt axonvégződés) megbízhatóan azonosíthatóak legyenek mindkét technikával, így a kétféle adat illesztése megoldható lett. Szoftverünkben megvalósítottuk mind a koordináta-alapú STORM mind a pixelintenzitás-alapú konfokális adatok hatékony kezelését, együttes megjelenítését és egymáshoz illesztését, így lehetőség nyílt azok korrelált analízisére is.



13. ábra Konfokális és STORM adatok együttes megjelenítése a korrelációs szoftverünk segítségével

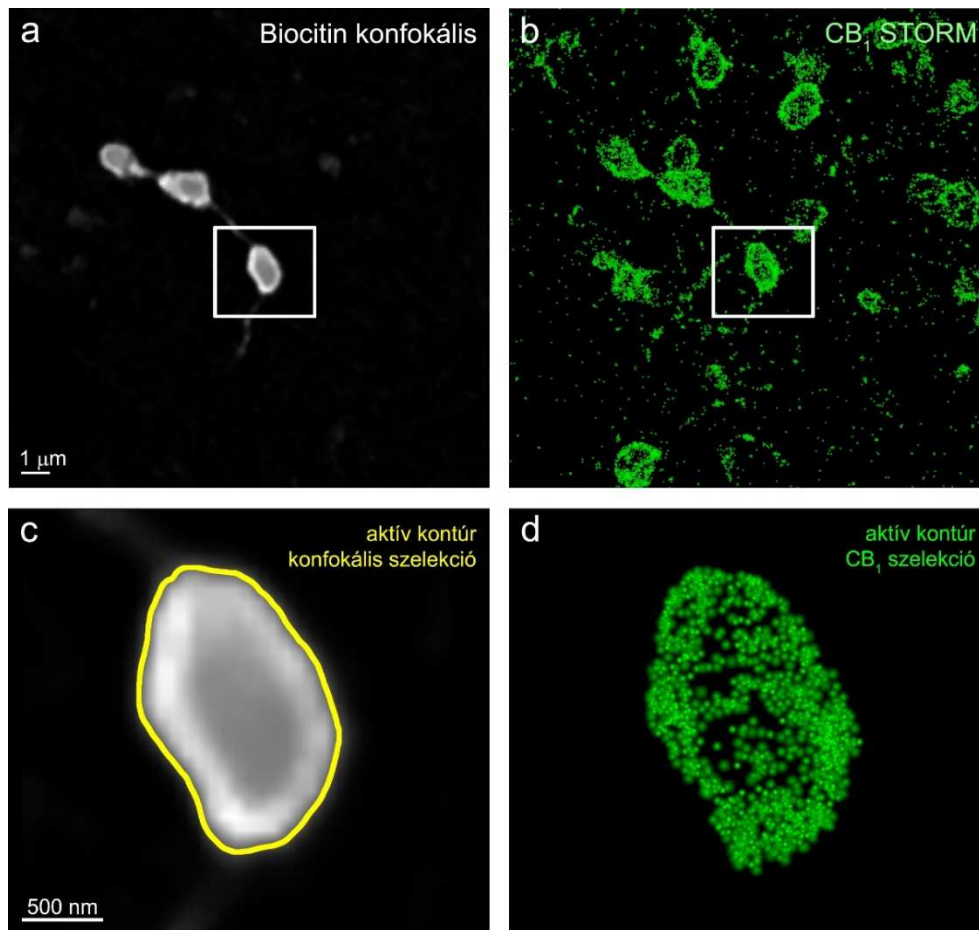
- CB₁ receptor elleni immunfestéssel készült dekonvolvált konfokális kép egér hippocampusz CA1 régiójából.
- Ugyanazon látótér STORM mikroszkópiával készült képe.
- Egyedi axonterminális CB₁ receptor elleni immunfestéssel készült dekonvolvált konfokális képe.
- Ugyanazon axonterminálison elhelyezkedő CB₁ receptorok STORM mikroszkópiával készült képe.
- Ugyanazon axonterminális megjelenítése a STORM adatok z koordinátája alapján megvalósított színezéssel.

5. 1. 3. Korrelált konfokális és STORM adatok sejtípus- és szubcelluláris domén-specifikus analízise

A program képes a STORM és konfokális adatok egyidejű megjelenítésére, egymáshoz illesztésére, így akár egyedileg azonosított töltött sejtekhez tartozó axonvégződéseket is képesek vagyunk elkülöníteni. Azonban felmerült a kérdés, hogy hogyan választhatók ki hatékonyan és objektív módon az egyes kompartmentekhez, jelen esetben egyedi axonvégzésekhez tartozó lokalizációs pontok koordinátái.

Szabadkézi kijelöléssel további analízis céljából elmenthetőek egyedileg kiválasztott CB₁ lokalizációs pontok, ám ez bizonytalanságot és szubjektivitást hozhat a rendszerbe, mivel a képet feldolgozó kutatónak kell döntenie arról, hogy egy lokalizációs pont beletartozik-e a vizsgált kompartmentbe, vagy pedig a háttér részének tekintendő. Ezen kívül a szabadkézi körberajzolás nagy mintaszámnál nem elég hatékony. Ezért az aktív kontúr nevű módszert alkalmaztuk a konfokális képeken a jelölt axonterminális határának eldöntéséhez.

Az aktív kontúrt biocitinnel töltött interneuronok axonvégzéseinek konfokális képén teszteltük. Kiindulási állapotnak olyan köröket választottunk, amelyek tartalmazzák a kiválasztani kívánt struktúrákat, ezekből indítottuk az algoritmust (14. ábra).



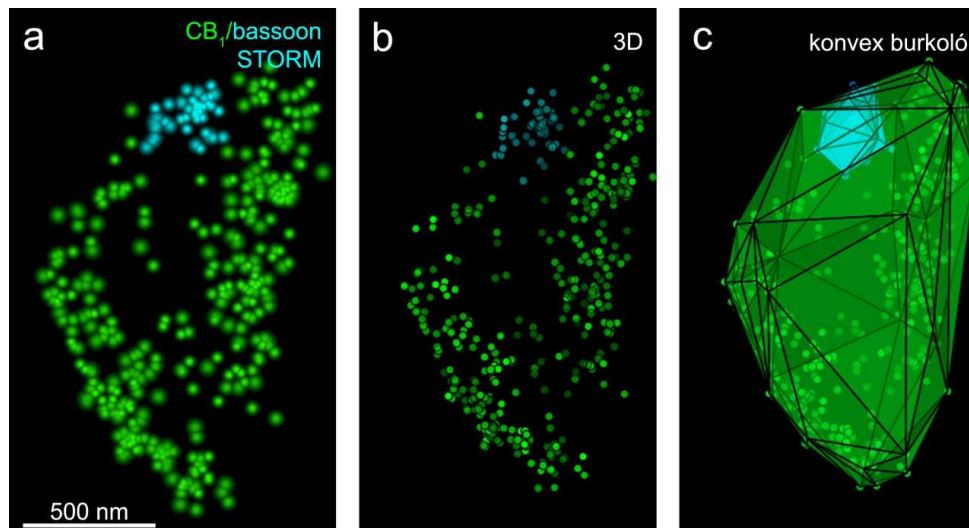
14. ábra Korrelált konfokális és STORM adatok sejt- és szubcelluláris doménspecifikus analízise

- a) Azonosított, biocitinnel töltött hippocampális CA1 interneuron axonterminálisainak dekonvolvált konfokális képe.
- b) Ugyanarról a látótérrel készült anti-CB₁ immunfestés STORM képe.
- c) Automatikus axonterminális kijelölés élmentes morfológiai aktív kontúrok (MACWE) segítségével.
- d) Az aktív kontúr szelekció segítségével objektív módon és egyszerűen kiválasztott, ugyanazon axonterminálishoz tartozó CB₁ STORM lokalizációs pontok. Az így elkülönített koordináták megjeleníthetők vagy elmenthetők későbbi analízis céljából.

5. 1. 4. STORM adatok három dimenziós megjelenítése

A STORM mikroszkópia képes három dimenziós koordináták felvételére, és az általunk vizsgált struktúrák természete is megköveteli, hogy a szoftverünk képes legyen három dimenziós megjelenítésre is, hiszen esetenként ez az egyetlen mód annak eldöntésére, hogy egy lokalizációs pont az általunk vizsgálni kívánt struktúrához tartozik-e vagy sem.

A szabadkézi kijelölés segítségével az egy axonterminálishoz tartozó lokalizációs pontok három dimenzióban is láttathatók, illetve a legkülső pontokra illesztett konvex burkolók segítenek az axonvégződés felszínének megjelenítésében, hiszen a CB₁ fehérje a membránban foglal helyet. Az ábrán a bassoon állványfehérje a szinapszis helyzetét jelöli [50] (15. ábra).

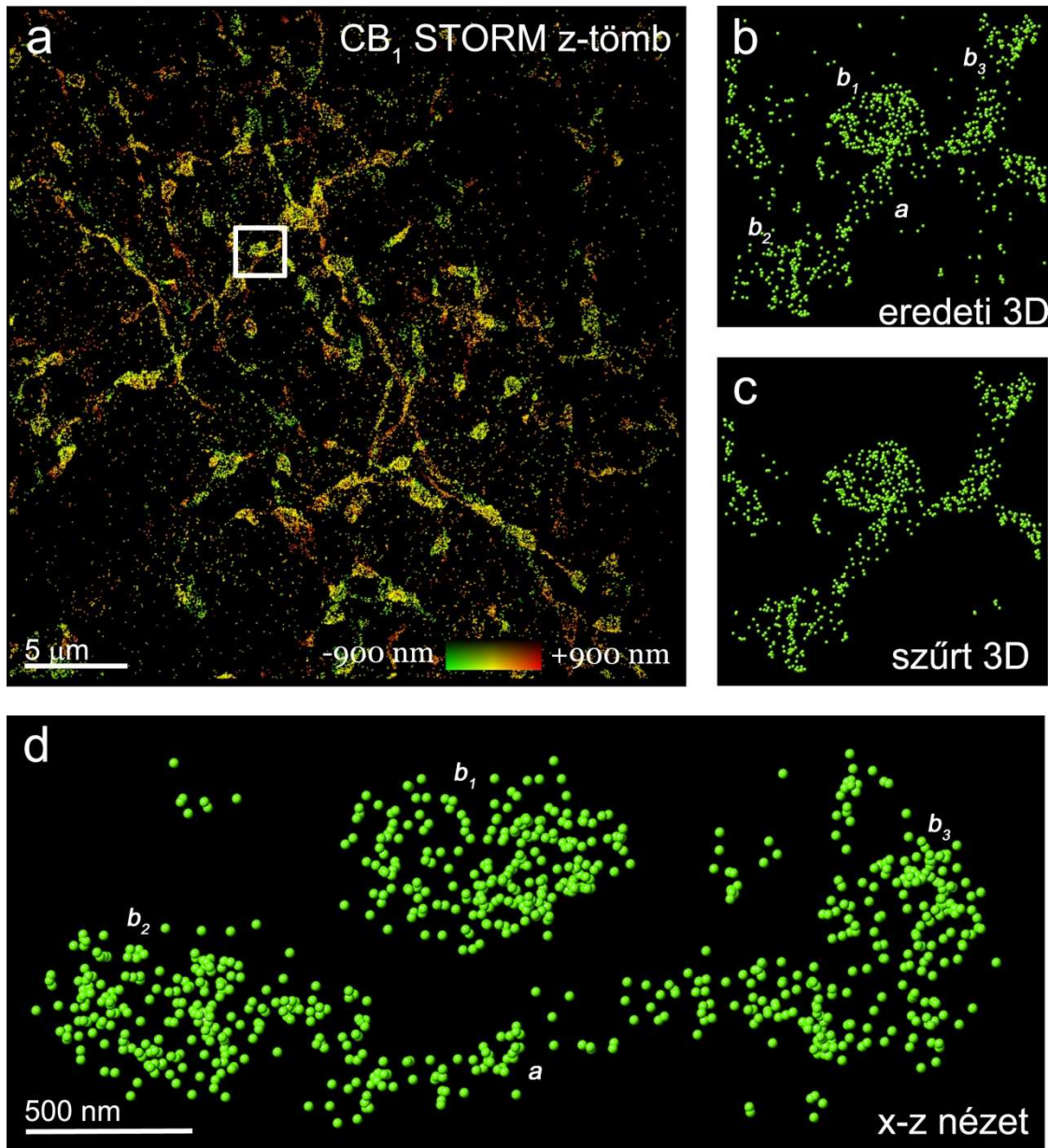


15. ábra STORM adatok három dimenziós megjelenítése

- a) Kettős STORM festés bassoon fehérjére (cián) és CB₁ receptorra (zöld) hippocampális CA1 interneuron axonterminálisában. A bassoon állványfehérje felhalmozódása szinapszis jelenlétére utal.
- b) Ugyanazon bassoon és CB₁ lokalizációs pontoknak a három dimenziós megjelenítése.
- c) Ugyanazon lokalizációs pontokra illesztett konvex burkolók (bassoon - cián, CB₁ - zöld) segítenek az axonterminális 3D rekonstrukciójában.

5. 1. 5. STORM z-tömbök feldolgozása és megjelenítése

A rendelkezésünkre álló STORM mikroszkóprendszerrel nem készíthető automatikus módon több síkból álló térfogat-rekonstrukció, de z-irányban eltolts felvételekből a szoftverünk segítségével generálhatunk nagyobb mélységet felölölő képet. Négy, 300 nm eltéréssel felvett átfedő adathalmazt használtunk fel, ezeket z-színkódolással ábrázoltuk. A képeken lokális sűrűség alapú szűrést alkalmaztunk, melynek során eltávolítottuk azokat a pontokat, amelyeknek 300 nm-es környezetében nincs legalább öt szomszédja. Ezáltal elértük a kis lokalizációs pont klaszterek eltávolítását, ezáltal csak a nagyobb struktúrák rajzolódtak ki. Egy kiválasztott axon és axonterminális 3D képen x-y irányból bemutatható, hogy bár ezek egymáshoz kapcsolódónak látszanak x-y nézetben, egy másik nézetből látszik, hogy ezek valójában egymás alatt helyezkednek el (16. ábra). Az ehhez hasonló térbeli információk gazdagíthatják a különböző analízisek információtartalmát, és rávilágítanak, hogy egyes esetekben nem elégséges a két dimenziós megjelenítés és adatfeldolgozás.

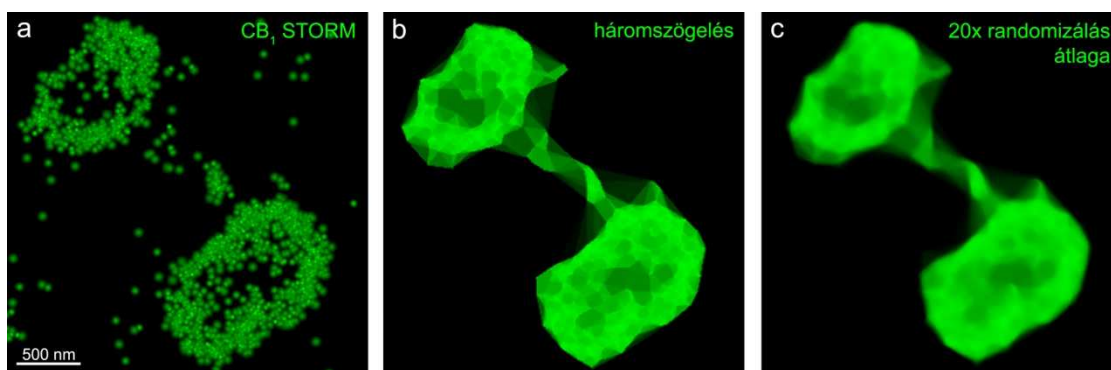


16. ábra Z-tömbök feldolgozása és megjelenítése

- a) STORM anti- CB_1 immunfestés hippocampusz CA1 régiójáról 4 átfedő, egymástól 300 nm távolságra lévő réteg alapján z-koordináta kódolással.
- b) Egy axon (a) és három axonterminális (b_1 , b_2 , b_3) 3D reprezentációja x-y nézetből. A struktúrákat CB_1 lokalizációk kis csoportjai veszik körül.
- c) Lokális sűrűség alapú szűrő algoritmus segítségével a kis CB_1 klaszterektől megtisztított kép, jól kivehető az axon és a terminálisok.
- d) Ugyanazon struktúrák 3D reprezentációja más látószögből. A STORM tömb feldolgozás és a 3D vizualizáció segítségével világossá vált, hogy az egyik axonterminális (b_1) az axon fölött helyezkedik el, nem pedig hozzá tartozik.

5. 1. 6. A Delaunay-háromszögelés felhasználása STORM adatok vizualizációjára

A konvencionális fénymikroszkópoktól eltérően a lokalizációs mikroszkópiás technikák nem különböző pixelintenzitású képet generálnak, hanem a meghatározott fluorofórok koordinátáinak listáját. Ezért ezek feldolgozása és képpé alakítása külön megfontolásokat igényel. Ezen kívül, mivel a STORM kép jellegében jelentősen eltér a megszokott mikroszkópos képektől, nehezíti a felvételek értelmezését. Mivel egy nemrégiben megjelent tanulmány rámutatott a Gauss-pontokon alapuló megjelenítés gyenge pontjaira a mintavételezés minősége kapcsán, ezért implementáltunk a szoftverünkbe egy a lokalizációs mikroszkópiás adatok alternatív megjelenítésére alkalmas algoritmust, a Delaunay-háromszögelést. Így a hagyományos mikroszkópos képekhez jobban hasonlító, ezáltal könnyebben értelmezhető, a struktúrák és a mintavételezés tulajdonságait jobban visszaadó képek állíthatók elő (17. ábra).



17. ábra Delaunay-háromszögelés felhasználása STORM adatok megjelenítésére

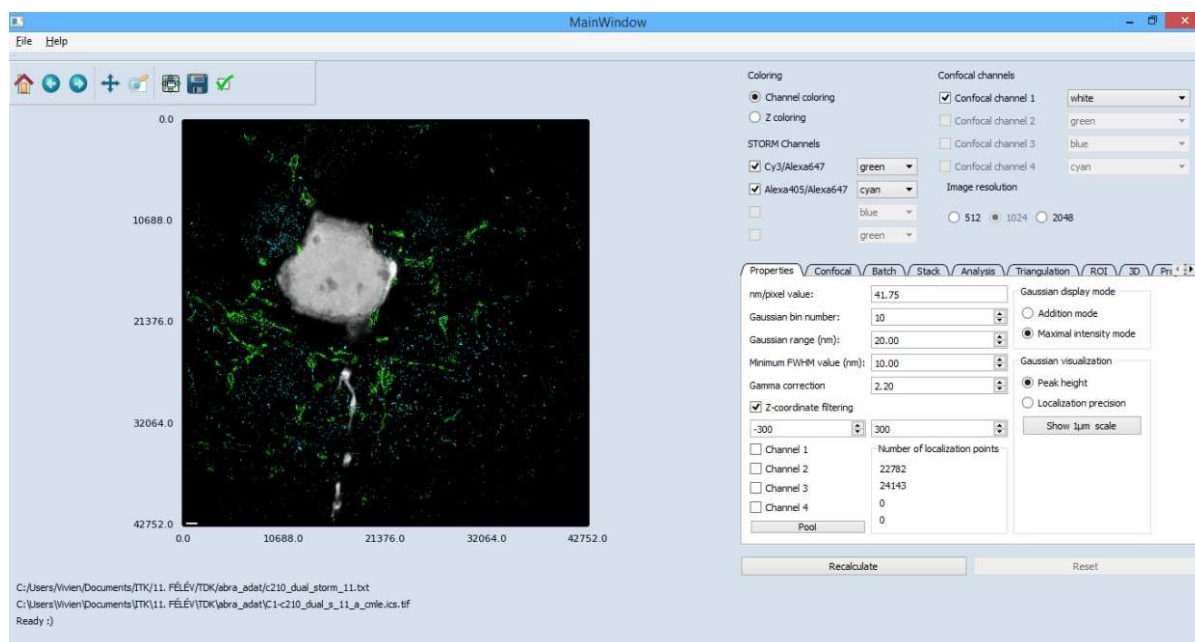
- a) Axonvégződés CB₁ STORM képe hippocampus CA1 régiójából.
b) STORM adatok Delaunay-háromszögeléssel készített megjelenítése. A háromszögek színezése a leghosszabb oldaluk nagyságával arányos. Minél hosszabb az oldal, annál sötétebb háromszöget kapunk. A koordinátákon lokális sűrűség alapú szűrést is végeztünk az elkülönült lokalizációs pontok eltávolítása érdekében.
c) A pontok lokalizációs precizitása alapján véletlenszerűen áthelyezett koordinátákkal nyert kép (n=20) átlaga. Az így készített vizualizáció előnye, hogy elnyomja a hibás részleteket a rosszul mintavételezett helyeken, de elkerüli a felbontáscsökkenést a jól mintavételezett területeken.

5. 1. 7. Könnyen kezelhető grafikus felhasználói felület

A könnyű kezelhetőség érdekében grafikus felhasználói felületet is készítettünk a programhoz, így a STORM és konfokális adatfájlok megnyitása, egymáshoz illesztése, különböző formátumokba való mentése, a képeken a nagyítási és kiválasztási funkciók egyszerűen hajthatók végre. A megjelenítés finomhangolható, lehetőség van csatornák, illetve z-pozíció szerinti színezésre, a Gauss-eloszlások méretének és fényességének

beállítására, illetve az egyes csatornák adatai összevonhatóak. Háromszögelés és három dimenziós megjelenítés is választható, illetve aktív kontúr alapú kiválasztás is elérhető. Sok esetben nagy mennyiségű minta feldolgozására van szükség, ezért beépítettünk egy erre alkalmas modult is a programba, így lehetőség nyílik az adatok gyors és egyszerű analizésére, kimeneti fájlok generálására.

A könnyű kezelhetőséget segíti, hogy a grafikus felhasználói felület egy standard Python modulra épül, így az itteni elemek képi világukban megszokottak a leendő felhasználónak, így könnyű rajtuk kiigazodni.



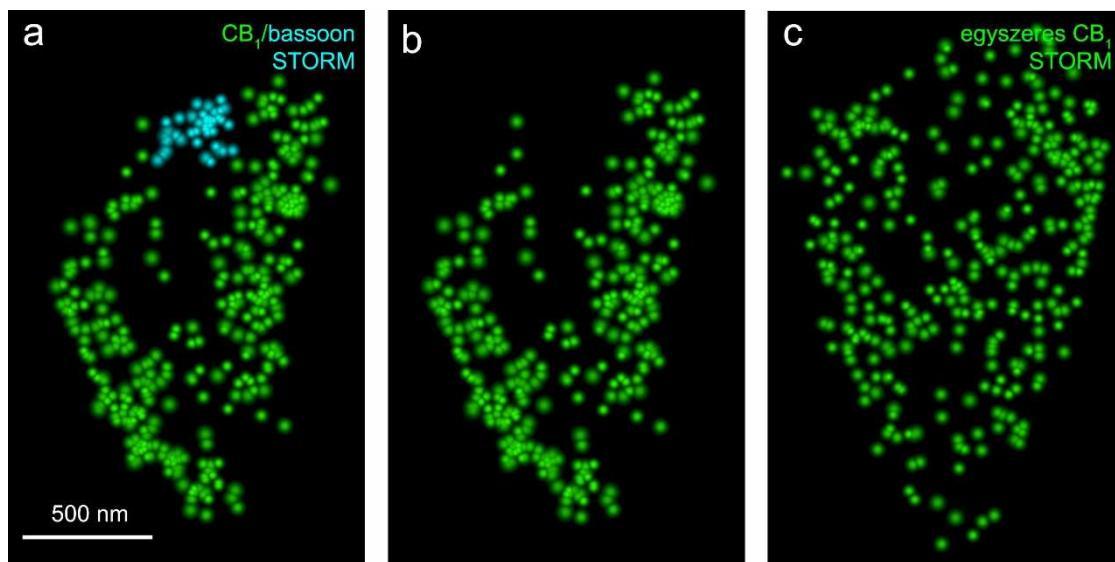
18. ábra A korrelációs szoftver grafikus felhasználói felülete

A képen jól látható, hogy a nagyszámú paraméter ellenére elkülönülnek a különböző részekhez tartozó elemek, így modulárisan könnyű kezelni a grafikus felhasználói felületet, és megtalálni a megfelelő beállításokat.

5. 2. CB₁ receptorok eloszlásának analízise hippocampusz CA1 piramisrétegében

A CB₁ kannabinoid receptor a neurotranszmittert tartalmazó vezikulák felszabadulását szabályozza a feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásán keresztül. Ez a folyamat a szinaptikus aktív zónában valósul meg, így azt szeretnénk volna vizsgálni, hogy bedúsulnak-e a receptorok az aktív zónában az axonterminálisokon belül.

Mivel az axonvégződés egyszeres CB₁-STORM képén nem látszanak a szinapszisok helyei, így az nem alkalmas önmagában kompartmentspecifikus analízisre. Így kutatócsoportunk a korábbi előkísérletek során CB₁-bassoon kettős STORM jelölést alkalmazott, mivel a bassoon preszinaptikus citomátrix fehérje kijelöli a szinapszisok helyzetét [50]. Ebben az immunfestés kombinációban nem vagy csak nagyon kis mértékben találtunk a szinapszis területén CB₁ receptor lokalizációkat, ami ellentmond annak a megfigyelésnek, miszerint a CB₁ az intraszinaptikusan elhelyezkedő feszültségfüggő kalciumcsatornák regulációjában játszik szerepet [51]. Ezen túl az egyszeres CB₁-STORM festésben nem találtunk a kettős festésben megfigyelt nagyarányú CB₁ receptorsűrűség-csökkenéseket (19. ábra).



19. ábra Különbségek a CB₁ festés jellegében kettős és egyszeres STORM képalkotás esetében

- a) Kettős anti-bassoon (cián) és anti-CB₁ (zöld) STORM festés hippocampális CA1 interneuron axonterminálisában.
- b) Ugyanazon festés csak a CB₁ receptorok ábrázolásával. Az aktív zónában nem látunk receptorokat, így az axonvégződés képén nagyfokú inhomogenitás figyelhető meg.
- c) Reprezentatív axonvégződés képe CB₁ STORM egyszeres festéssel hippocampális CA1 interneuron axonterminálisában. Az ilyen módszerrel készült képeken általában nem figyelhető meg a b) ábrán mutatott inhomogenitás a bouton területén. (kísérlet: Dudok Barna és Barna László)

Ezt az ellentmondást többféleképpen lehet magyarázni:

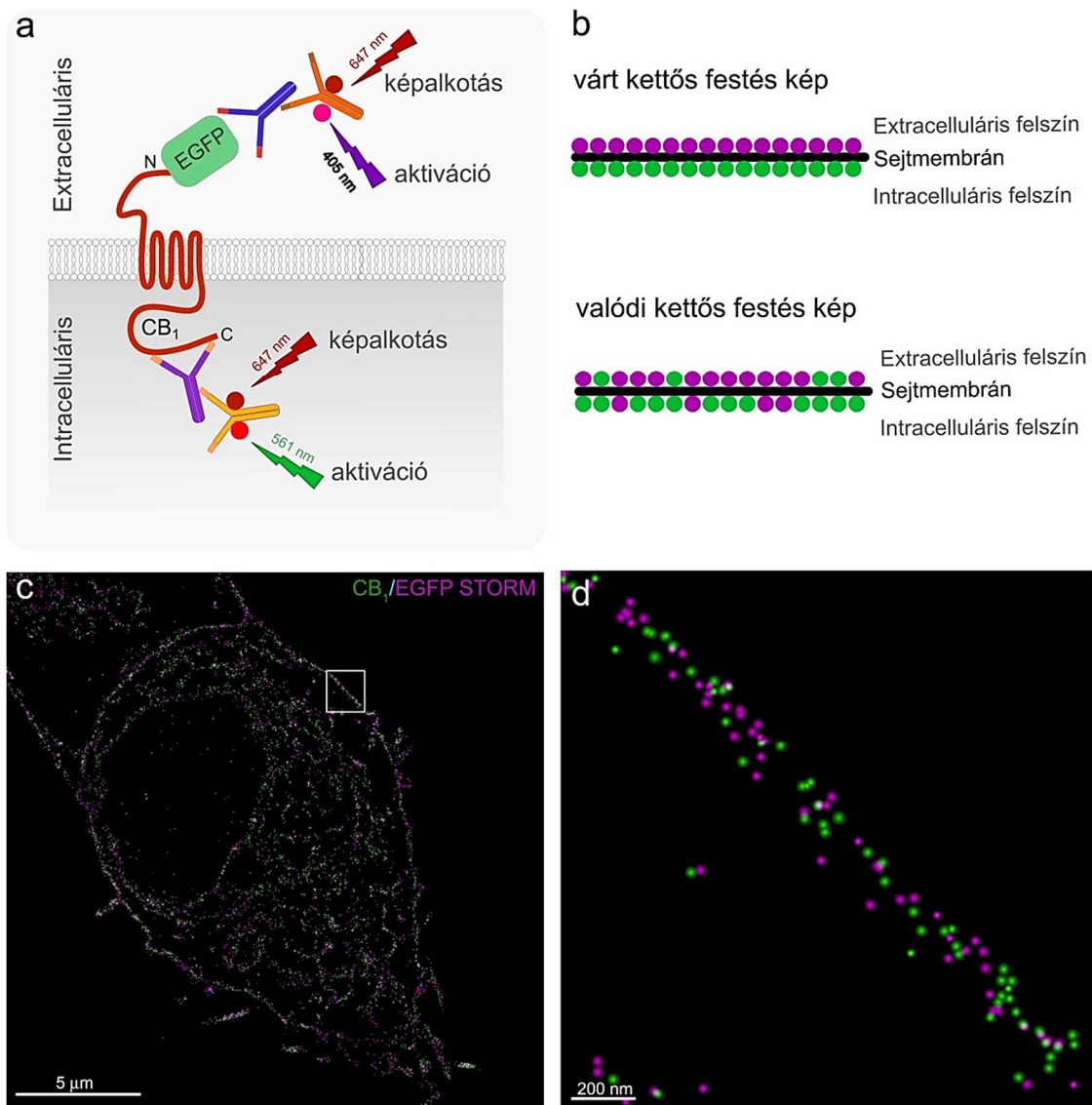
a) valóban nem találhatóak CB₁ receptorok a szinapszis területén, bár ennek ellentmondanak az egyszeres STORM festéssel és a receptor funkciójával összefüggő tapasztalataink,

b) valamilyen sztérikus ok, esetleg az antitestek kölcsönhatása miatt nem sikerül jelölni az aktív zónában a receptorokat;

c) a jelenség a kettős STORM festés tulajdonságaiból adódik, ugyanis a csatornák jeleinek elkülönítéséhez crosstalk-korrekcióra van szükség, mely algoritmus a lokális sűrűségek alapján korrigálja az egyedi fluorofórok adott csatornához való tartozásának valószínűségét [42].

Az algoritmus megbízhatóságának tesztelésére az alábbi kísérletet végeztük:

HEK (humán embrionális vese sejtvonalból származó) sejteket transzfektáltunk olyan fúziós fehérjét kódoló konstrukcióval, amely a CB₁ fehérje N-terminálisához kötve EGFP-t (zöld fluoreszcens fehérje) tartalmazott. Ezeket a sejteket aztán kettős STORM festéssel vizsgáltuk: az egyik elsődleges antitest a CB₁ C-terminális részét, a másik pedig az EGFP-t ismerte fel. Ez alapján azt vártuk, hogy a STORM képen a különböző színű lokalizációs pontok két elkülönült csoportját fogjuk látni, ám ehelyett azok véletlenszerű keveredését figyeltük meg. Ez arra utal, hogy az egymáshoz túl közel lévő különböző csatornák áthallása valóban mérési hibához vezethet (20. ábra).



20. ábra Egymáshoz közeli csatornákból származó kettős STORM jelek jellegének vizsgálata

a) A kontrollkísérlet elvi sémája: HEK sejteket olyan CB_1 -receptorral transzfektáltunk, melynek N-terminálisához EGFP-t fuzionáltunk. A kettős STORM immunfestést CB_1 C-terminálisa és EGFP ellen végeztük el, emellett különböző aktivátor fluorofórt tartalmazó szekunder antitesteket használtunk.

b) A sejtmembrán mentén világosan elkülöníthető lokalizációs pontokat vártunk, ám azok keverten helyezkedtek a STORM képen, ebből arra lehet következtetni, hogy a térben közel álló különböző fluorofórok felismerése problémát jelent a képalkotó rendszernek.

c) Transzfektált HEK sejt kettős STORM képe anti- CB_1 (zöld) és anti-EGFP (bíborvörös) festéssel.

d) A fehér négyzettel (c) jelölt membránszakasz képe nagyobb nagyításban.

(ábra és kísérlet: Barna László és Dudok Barna)

A második és harmadik hibalehetőség kizárása érdekében egyszeres STORM jelöléssel vizsgáltuk a CB_1 receptorok szubcelluláris eloszlását. Az axonterminális szinaptikus zónáját neuroligin-2 festés konfokális mikroszkópiás képének felhasználásával jelöltük ki a CB_1 -STORM képeken.

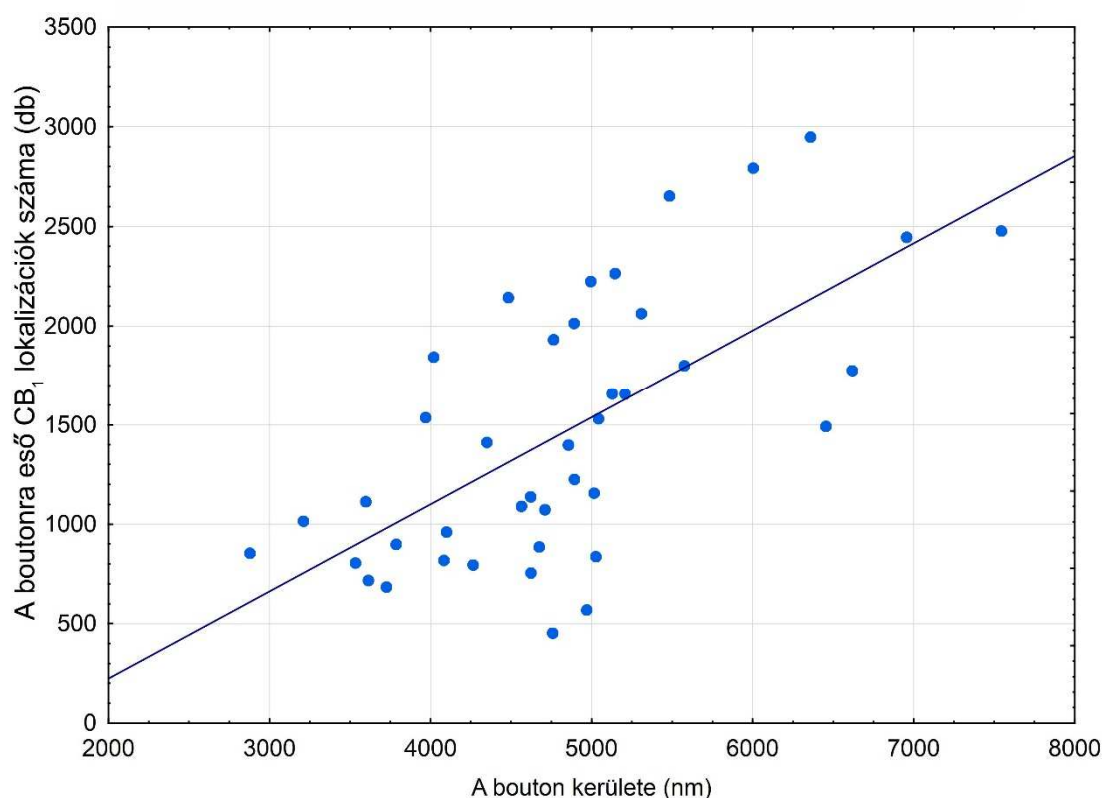
A neuroligin-2 poszt-szinaptikus aktív zóna marker a gátló szinapszisokban [52, 53], így nem lehetséges sztérikus összeférhetetlenség a két típusú antitest számára. Mivel csak egy

csatornát vettünk fel STORM mikroszkópiával, ezért nem érvényesül a crosstalk-korrekciónak torzító hatása sem.

Perfundált egéragy metszeteken kettős fluoreszcens immunfestést végeztünk CB₁ és neuroligin-2 ellen, és a hippocampusz CA1 piramistrétegében korrelált konfokális és STORM képeket vettünk fel. A posztzinaptikus aktív zóna marker neuroligin-2 konfokális képének segítségével meghatároztuk a szinapszisok helyzetét.

5. 2. 1. A CB₁ receptorok száma korrelál az axonvégződés méretével

Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy függ-e a CB₁ receptorok száma a bouton méretétől. A konvex burkoló alapján becsült membránhossz meghatározása után azt mutattuk ki, hogy az egyes axonvégzésekben a receptorszám lineáris összefüggést mutat a mérettel (21. ábra). Mivel a CB₁ lokalizációs pontok száma arányos a bouton membránjának hosszával, így a lokalizációs pontok száma osztva a kerülettel, mint a receptor sűrűséget kifejező mérőszám alkalmazható.

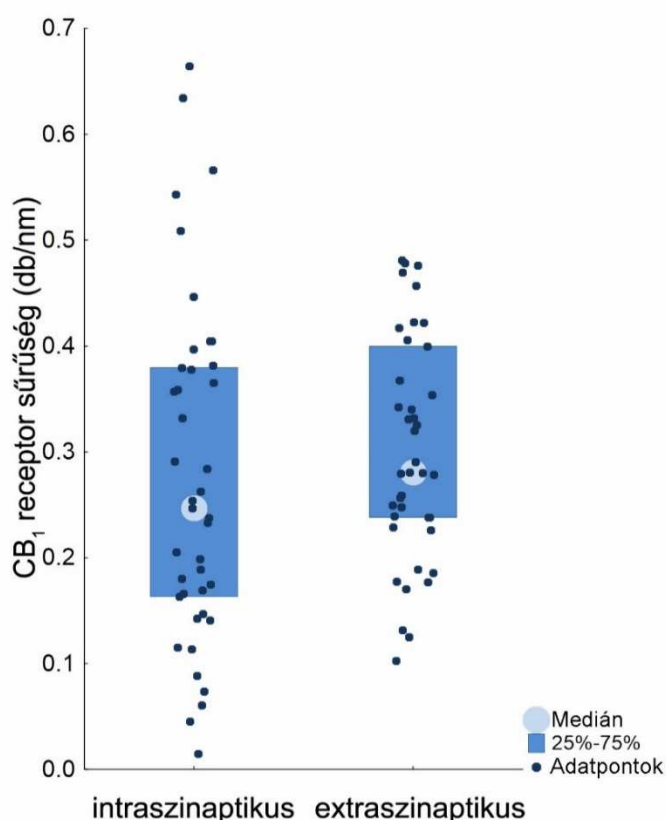


21. ábra A hippocampusz CA1 régiójának piramistrétegében vizsgált axonvégzésekben lévő CB₁ lokalizációk száma és a bouton becsült kerülete lineáris összefüggést mutat.

(n=41 vizsgált bouton, n=3 állat, Spearman-féle rang korreláció, $R=0.6463$, $p < 0.01$)

5. 2. 2. CB₁ receptorok szubcelluláris kompartmentsspecifikus sűrűségének összehasonlítása

A CB₁-neurologin-2 kettős festés alapján meghatároztuk a szinapszis helyét az axonvégződésen, és az egyes CB₁ lokalizációs pontokat intraszinaptikus vagy extraszinaptikus kategóriákba soroltuk be, attól függően, hogy az intraszinaptikus vagy az extraszinaptikus konvex burkolórésshez voltak közelebb. Ezután az egyes boutonokban lemértük az intraszinaptikus, illetve az extraszinaptikus membrán hosszát, valamint a két kompartmenthez tartozó receptorok számát. A receptorok sűrűségét a receptorszám és a megfelelő területdarab hányadosával definiáltuk. Ez alapján azt találtuk, hogy a CB₁ receptorok átlagos sűrűsége a várttal ellentétben nem tér el szignifikánsan az intraszinaptikus és az extraszinaptikus zónában (22. ábra). Ez azért is meglepő eredmény, mivel a CB₁ receptor a neurotranszmittert tartalmazó vezikulák fúzióját gátolja a Ca²⁺-csatornák blokkolásán keresztül, és a vezikulák fúziója a boutonok neurologin-2 felé eső oldalán történik meg.



22. ábra CB₁ receptorok szubcelluláris kompartmentsspecifikus sűrűségének összehasonlítása

A CB₁ receptorok sűrűségében nem találtunk szignifikáns különbséget az intraszinaptikus és az extraszinaptikus csoportok között (n=41 bouton, n=3 állat, előjel próba, p=0.1183).

5. 3. Az eredmények értékelése

5. 3. 1. Szoftver fejlesztése STORM és konfokális adatok korrelált elemzésére

A korábban rendelkezésre álló szoftverek széles tárháza alkalmas a hagyományos pixelintenzitás-alapú képek kezelésére és azok feldolgozására. A szuperrezolúciós adatok kezelésére képes programok között már kisebb a választék, és ezek jórészt a STORM lokalizációk képként való megjelenítését végzik, kevésbé használják ki a koordináta-alapú adattárolás és a nanoskálájú felbontás előnyeit.

Mivel a STORM képeken nem látszanak a sejtek, illetve szubcelluláris kompartmentek határai, illetve nincs lehetőség sejttypus- és sejt-specifikus analízisre, ezért felmerült az igény a szuperrezolúciós mikroszkópiának a konfokális képalkotás előnyeivel való kiegészítésre. Ám eddig nem létezett olyan szoftver, amely képes lett volna a STORM és konfokális adatok korrelált vizualizációjára és analízisére.

A tudományos diákköri munka keretén belül elsőként fejlesztettünk szoftvert ilyen célokra, így lehetőség nyílt adott célfehérjék mennyiségének és elhelyezkedésének nanoskálájú precizitással történő mérésére sejttypus- és kompartment-specifikus módon. A szoftver alkalmas a kétféle modalitású adat beolvasására, megjelenítésére, egymáshoz illesztésére, különböző formátumokba való mentésére. A képeken nagyítási és kiválasztási funkciók egyszerűen hajthatók végre, a megjelenítés finomhangolható. A STORM adatokat hagyományos Gauss-eloszlás alapú felhőkkel, illetve Delaunay-háromszögeléssel is lehet ábrázolni, mindkettő képes az egyes pontok lokalizációs precizitásának tükrözésére. A z-irányú pozíció két dimenzióban színekódolással vagy három dimenziós megjelenítéssel láttatható. A lokalizációs pontok alcsoportjai szabadkézi, illetve aktív kontúr alapú kiválasztással elkülöníthetők. Nagy mennyiségű képen is egyszerűen elvégezhetőek az analízisek az erre alkalmas modul segítségével. A programhoz könnyen kezelhető grafikus felhasználói felület tartozik.

A jövőben szeretnénk a szoftvert további analízis eszközökkel kibővíteni. Mivel alkalmas más fehérjék szuperrezolúciós eloszlásának vizsgálatára is, ezért szeretnénk nyílt forráskóddal elérhetővé tenni más kutatócsoportok számára is.

5. 3. 2. A CB₁ receptorok szubcelluláris eloszlásának vizsgálata

Az új szoftver segítségével kimutattuk, hogy az egyes axonvégződéseken a CB₁ receptorszám lineáris összefüggést mutat a mérettel. Ez összhangban áll kutatócsoportunk korábbi megfigyeléseivel [54]. Mivel a CB₁ lokalizációs pontok száma arányos a bouton membránjának hosszával, így a lokalizációs pontok száma/kerület mérőszám alkalmas a receptorsűrűség kifejezésére.

A szinapszisok helyzetét jelölő neuroligin-2 és CB₁ kettős festés, a korrelált STORM és konfokális képalkotás, valamint az analízis segítségével megmutattuk, hogy a CB₁ receptorok átlagos sűrűsége nem tér el az intraszinaptikus és az extraszinaptikus zónában a hippocampális gátló interneuronok axonvégződéseiben.

Ez azért meglepő, mert a receptor a neurotranszmittert tartalmazó vezikulák membránfúzióját szabályozza feszültségfüggő kalciumcsatornák zárásán keresztül [51], ez a jelenség viszont a szinaptikus zónában történik meg. Korábban a receptor helyzetének vizsgálatában némileg egymásnak ellentmondó eredmények születtek: míg elektronmikroszkópos vizsgálatokkal bedúsulást mutattak ki a periszinaptikus zónában [27], primer neuronális sejt kultúrában a CB₁ receptorok szabad diffúzióját mutatták meg, mely speciális horgonyzó mechanizmus hiányára utal [28]. Az általunk végzett kísérletek adatai az utóbbi álláspontot támogatják. Az ellentét feloldására egy lehetséges magyarázat, hogy az elektronmikroszkópos mérések előkészítése során a minták dehidráálásának következtében potenciálisan fellépő anizotróp zsugorodás torzíthatja az ilyen módszerrel végzett nanoskálájú fehérje-lokalizációs mérések eredményeit, ám ez a STORM mikroszkópia alkalmazásával elkerülhető.

Felmerül a kérdés, hogy miért van ilyen sok receptor ezeken az axonvégződéseken, illetve hogy miért így helyezkednek el. Egy lehetséges magyarázat az állandó kismértékű, azaz tonikus endokannabinoid jelátvitelben lehet, melynek során folyamatosan érkeznek az endokannabinoid molekulák a receptorokhoz, így azok internalizálódását válthatják ki [55-57]. Így kézenfekvő lenne, hogy a nagyszámú receptor a bouton felületén utánpótlásként szolgál. A homogén elrendezés pedig bekövetkezhet azért, mert a szabad diffúzió következtében az axonvégződésen így találnak helyet maguknak a receptorok véletlenszerű mozgásuk közben.

Ennek ellenére nem kizárt, hogy a szinapszis közelében lévő receptorkészletnek eltérő szerepe van a többihez képest. Ezt a hipotézist egy a CB₁ receptorok számát befolyásoló

beavatkozással lesz célszerű tesztelni a jövőben. Eredményeink számos további kérdést vetnek fel. Ezek megválaszolásához az analízis továbbfejlesztése lesz szükséges annak érdekében, hogy minél pontosabban tudjuk jelölni a szinapszis vélt helyzetét, és ezáltal pontosabban osztályozhassuk a CB₁ receptorokat. Ehhez szükséges még a neuroligin-2-CB₁ kettős festés további optimalizálása a jel-zaj viszony növelésének érdekében, valamint javíthatja a mintavételezés minőségét, ha biocitinnel töltött egyedileg azonosított interneuronok axonvégződésein végezhetünk vizsgálatokat. Ezen kívül tervezünk különböző hullámhosszú riporter festékekkel végzett kettős STORM kísérleteket is, ezáltal két különböző fehérje (pl. a CB₁ receptort és a neuroligin-2 posztzinaptikus markert) nanoskálájú elhelyezkedését lennénk képesek egyszerre, egymáshoz képest vizsgálni anélkül, hogy a csatornák közötti áthallás mérési hibákhoz vezetne. Az endokannabinoid rendszer plaszticitását vizsgáló szubcelluláris kompartment-specifikus méréseink reményeink szerint segítenek majd megérteni a receptorok eloszlását szabályozó mechanizmusokat is.