

A SZUPERREZOLÚCIÓS STORM KÉPALKOTÁS FELHASZNÁLÁSA AZ IDEGTUDOMÁNYBAN

Készítette:

Miczán Vivien

Orvosi biotechnológia MSc

Témavezető:

Dr. Katona István

MTA-KOKI

Belső konzulens:

Dr. Horváth András

PPKE-ITK



2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék	6
2. Összefoglalás	8
3. Summary	9
4. Bevezetés	10
4. 1. A szinaptikus endokannabinoid jelpálya	10
4. 2. A hippocampusz felépítése.....	12
4. 3. A CB ₁ receptorok eloszlása	15
4. 4. A szuperrezolúciós mikroszkópia lehetőségei a molekuláris neuroanatómiában.....	16
4. 5. A STORM képalkotás	22
4. 6. Vizualizációs és analízis eszközök STORM szuperrezolúciós mikroszkópiához	26
4. 7. Célkitűzés	27
5. A kísérletekhez felhasznált anyagok és eszközök	28
5. 1. Perfúzió és metszetek készítése	28
5. 2. Immunfestés	28
5. 3. Kombinált konfokális/STORM képalkotás	29
5. 4. Kombinált konfokális/STORM képfeldolgozás	30
5. 5. Intrazsinaptikus - extraszinaptikus sűrűséganalízis	30
5. 6. Statisztikai analízis és ábrakészítés	31
5. 7. A korrelációs szoftverben használt speciális algoritmusok	32
5. 7. 1. Aktív kontúr.....	32
5. 7. 2. Alternatív eszközök STORM koordináták megjelenítésére	33
6. Eredmények.....	36
6. 1. A korrelációs szoftver funkcióinak bemutatása.....	36
6. 1. 1. A STORM koordináták megjelenítése.....	37
6. 1. 2. Konfokális és STORM adatok korrelált megjelenítése	37
6. 1. 3. Korrelált konfokális és STORM adatok sejttípus- és szubcelluláris domén- specifikus analízise	39
6. 1. 4. STORM adatok három dimenziós megjelenítése	41

6. 1. 5. STORM z-tömbök feldolgozása és megjelenítése.....	41
6. 1. 6. A Delaunay-háromszögelés felhasználása STORM adatok vizualizációjára	43
6. 1. 7. Könnyen kezelhető grafikus felhasználói felület.....	44
6. 2. CB ₁ receptorok eloszlásának analízise hippocampusz CA1 piramisrétegében	45
6. 2. 1 A CB ₁ receptorok száma korrelál az axonvégződés méretével	48
6. 2. 2. CB ₁ receptorok szubcelluláris kompartment-specifikus sűrűségének összehasonlítása.....	49
7. Diszkusszió.....	50
7. 1. Szoftver fejlesztése STORM és konfokális adatok korrelált elemzésére	50
7. 2. A CB ₁ receptorok szubcelluláris eloszlásának vizsgálata.....	51
8. Köszönetnyilvánítás	53
9. Szerzői hozzájárulás	54
10. Irodalomjegyzék	55

Témabejelentő eredeti példánya

Alulírott Miczán Vivien, a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karának hallgatója kijelentem, hogy ezt a szakdolgozatot meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem, és a szakdolgozatban csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen a forrás megadásával megjelöltem. Ezt a szakdolgozatot más szakon még nem nyújtottam be.

.....
Miczán Vivien

1. Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Angol/latin elnevezés	Magyar elnevezés
APD	Avalanche Photodiode	lavina fotodióda
CA	Cornu Ammonis	Ammon-szarv, a hippocampusz része
CB₁	Cannabinoid Receptor Type-1	1-es típusú kannabinoid receptor
CCD	Charge Coupled Device	töltéscsatolt eszköz
CCK	Cholecystokinin	cholecystokinin
CMOS	Complementary Metal-Oxide Semiconductor	komplementer fém-oxid félvezető
DAG	Diacylglycerol	diacilglicerol
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole	4,6-diamino-2-fenilindol
DGL-α	Diacylglycerol Lipase- α	diacilglicerol-lipáz- α
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	zöld fluoreszcens protein
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device	elektronsokszorozó töltés-csatolt eszköz
GLU	Glutamate	glutaminsav
HEK	Human Embryonic Kidney	humán embrionális vese
IP₃	Inositol Trisphosphate	inozitol-triszfoszfát
MACWE	Morphological Active Contours Without Edges	élmentes morfológiai aktív kontúrok
MGL	Monoacylglycerol Lipase	monoacilglicerol-lipáz
mGluR	Metabotrope Glutamate Receptor	metabotróp glutamát receptor
NLP	Number of Localization Points	lokalizációs pontok száma
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-metil-D-aszpartát
NSOM/SNOM	Near-field Scanning Optical Microscopy	közeli látóterű pásztázó optikai mikroszkópia
O-LM	Oriens-Lacunosum Moleculare	a stratum oriens/ lacunosum molecularében (elhelyezkedő interneuron)
PALM	Photoactivated Localization Microscopy	fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia
PB	Phosphate Buffer	foszfát puffer
PFA	Paraformaldehyde	paraformaldehid
PFS	Perfect Focus System	fókuszstabilizáló rendszer

PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PLC-β	Phospholipase C-β	foszfolipáz C-β
PMT	Photomultiplier Tube	fotoelektron-sokszorozó
PSD	Postsynaptic Density	posztzinaptikus denzitás
PSF	Point Spread Function	pontválasz függvény
PSM	Perisynaptic Signaling Machinery	periszinaptikus jelátviteli rendszer
SIM	Structured Illumination Microscopy	strukturált megvilágítás mikroszkópia
STED	Stimulated Emission Depletion Microscopy	stimulált emisszió deplécio mikroszkópia
STORM	STochastic Optical Reconstruction Microscopy	sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia
TBS	Tris-buffered Saline	Tris puffer fiziológiás sóval
THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol	delta-9-tetrahidrokannabinol
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence	teljes belső visszaverődés fluoreszcencia
VGLuT	Vesicular Glutamate Transporter	vezikuláris glutamát transzporter
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide	vazoaktív intesztinális polipeptid

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 analizéséhez 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 diplomamunka keretén belül tehát elsőként fejlesztettünk szoftvert a STORM és konfokális mikroszkópiás adatok korrelált analizéséhez, valamint ennek segítségével kimutattuk a CB₁ receptorok homogén eloszlását a gátló axonvégzésekben.

3. Summary

The operational principles and plasticity of chemical synapses in the brain cannot be understood without a better knowledge on the distribution and quantity of synaptic proteins. The endocannabinoid signalling system plays a key role in the regulation of neurotransmitter release in various different synapse types of the central nervous system. Nonetheless little is known about the regulation of the amount and subcellular distribution of the CB₁ cannabinoid receptor which is situated in axon terminals and mediates retrograde synaptic transmission. We choose STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) to study the nanoscale distribution of the CB₁ receptors, which offers a spatial resolution at an order of magnitude better than achievable with conventional light microscopy. We combined the STORM method with confocal microscopy to obtain superresolution data with cell- and compartment-specific context regarding the molecular distribution of the selected protein. We developed an easy-to-use and flexible software for the evaluation of the different image modalities and for the coordinate-based analysis of STORM data. We performed double anti-CB₁ and anti-neurologin-2 fluorescent immunostaining on perfused mouse hippocampal slices and used correlated confocal and STORM imaging. We determined the location of the synapses with the help of the confocal image of the postsynaptic active zone marker neurologin-2. We showed that CB₁ receptor number correlates with bouton size, and surprisingly, CB₁ receptor density was similar in the intrasynaptic and the extrasynaptic zone. We have developed the first software for correlated visualization and analysis of confocal and STORM data and used this tool to show the homogenous distribution of CB₁ receptors in inhibitory axon terminals.

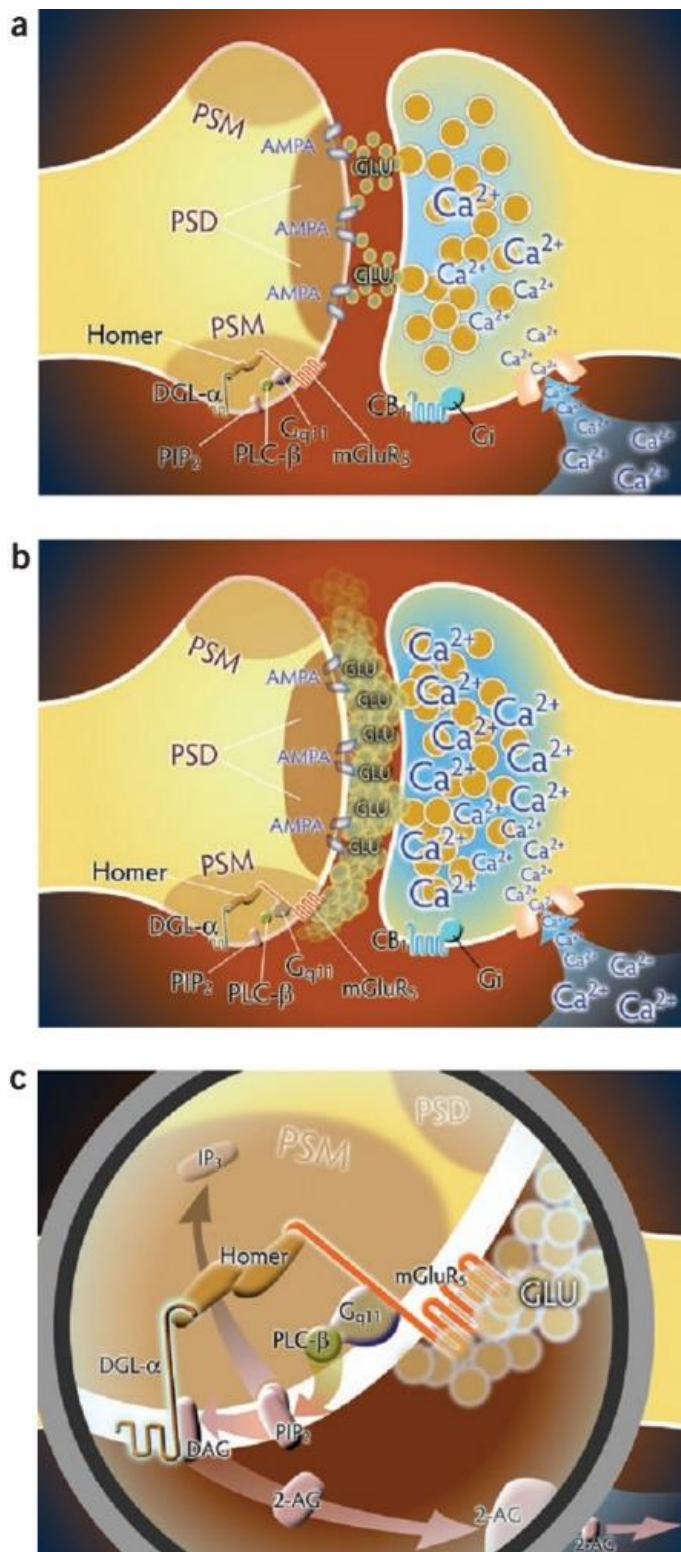
4. Bevezetés

4. 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 (diacylglycerol-lipáz- α) [3] és az MGL (monoacylglycerol-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 Gq11 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)

4. 2. A hippocampusz felépítése

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 kéregrésztlet, nevét alakjának a csikóhallal való hasonlósága miatt kapta [14]. Az emléknymok rögzítésében, illetve a térbeli tájékozódásban fontos agyterület [15]. Két nagyobb részre, a gyrus dentatusra és a cornu ammonisra (CA) tagolódik, utóbbi rágcsálókban 1-től 3-ig számozott régiókból áll.

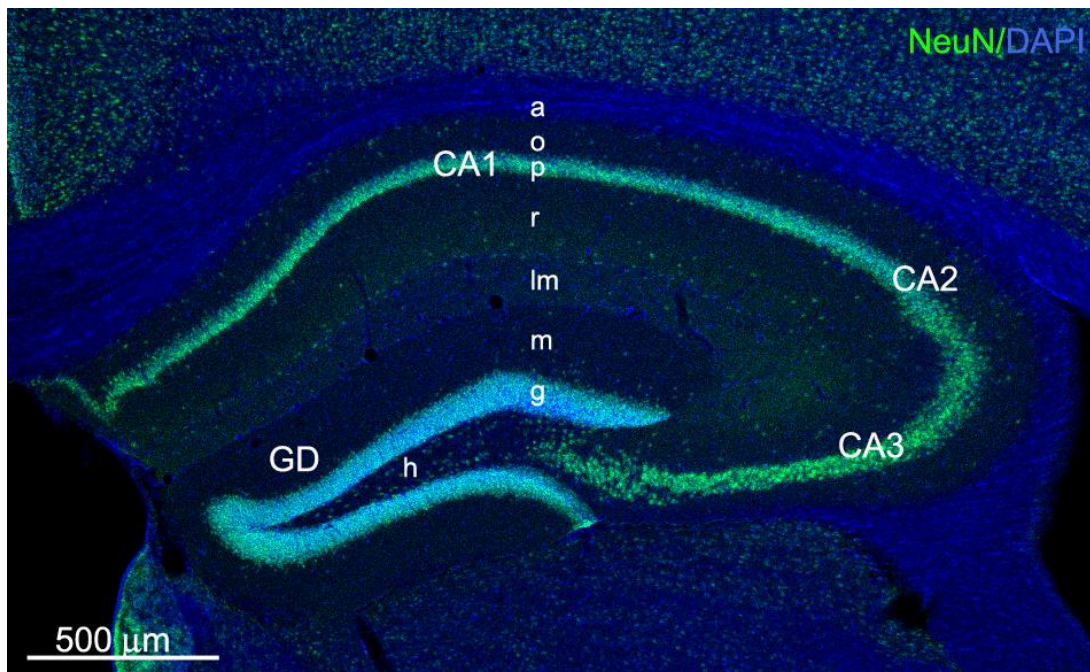
A gyrus dentatus réteges szerkezetű [16]:

- A *hilus* sok interneuront és mohasejtet tartalmaz, valamint a szemcsesejtek axonjai futnak benne a CA3 régió felé.
- A *stratum granulosum* a szemcsesejtek sejttestjeit tartalmazza.
- A *stratum moleculare* belső egyharmadában az ellenoldali gyrus dentatus mohasejtjeiből érkező commissurális rostok alkotnak szinapszisokat, illetve a szupramammilláris magból érkező bemenetek végződnek szemcsesejtek proximális dendritjein. A külső kétharmadban perforáns pálya rostok futnak, melyek a szemcsesejtek disztális dendritjein serkentő szinapszisokat alkotnak.

A CA régiók szintén rétegekre tagolódnak, melyek sorrendben a következők (2. ábra) [16]:

- Az *alveus* a legmélyebb réteg, és piramissejtek axonjai futnak benne a fornix felé.
- A *stratum oriens*ben gátló kosársejtek és trilamináris sejtek sejttestjei, valamint piramissejtek bazális dendritjei helyezkednek el, melyek más piramissejtektől, szeptális kolinerg és kommisszurális glutamáterg rostoktól kapnak itt bemenetet.
- A *stratum pyramidale*, más néven piramisréteg tartalmazza a piramissejtek sejttestjeit, melyek a hippocampusz principális serkentő neuronjai. Szintén megtalálhatók itt különböző interneuronok, axo-axonikus, kétrétegű és radiális trilamináris sejtek sejttestjei.
- A *stratum lucidum* csupán a CA3 régióban található meg. A gyrus dentatus szemcsesejtjeinek moharostjai szinaptizálnak itt a piramissejtek proximális dendritjein.
- A *stratum radiatum* szeptális, kommisszurális és Schaffer-kollaterális rostokat tartalmaz, utóbbiak a CA3 felől vetítenek a CA1-be. Kosársejtek, kétrétegű és radiális trilamináris sejtek is megtalálhatók itt.

- A *stratum lacunosum-moleculare* a hippocampusz legkülső rétege, melyben a perforáns pálya rostjai szinaptizálnak piramis sejtek disztális, apikális dendritjeivel.
- A *hippokampális sulcus* egy sejtmentes régió, mely elválasztja a CA1-et a gyrus dentatustól.



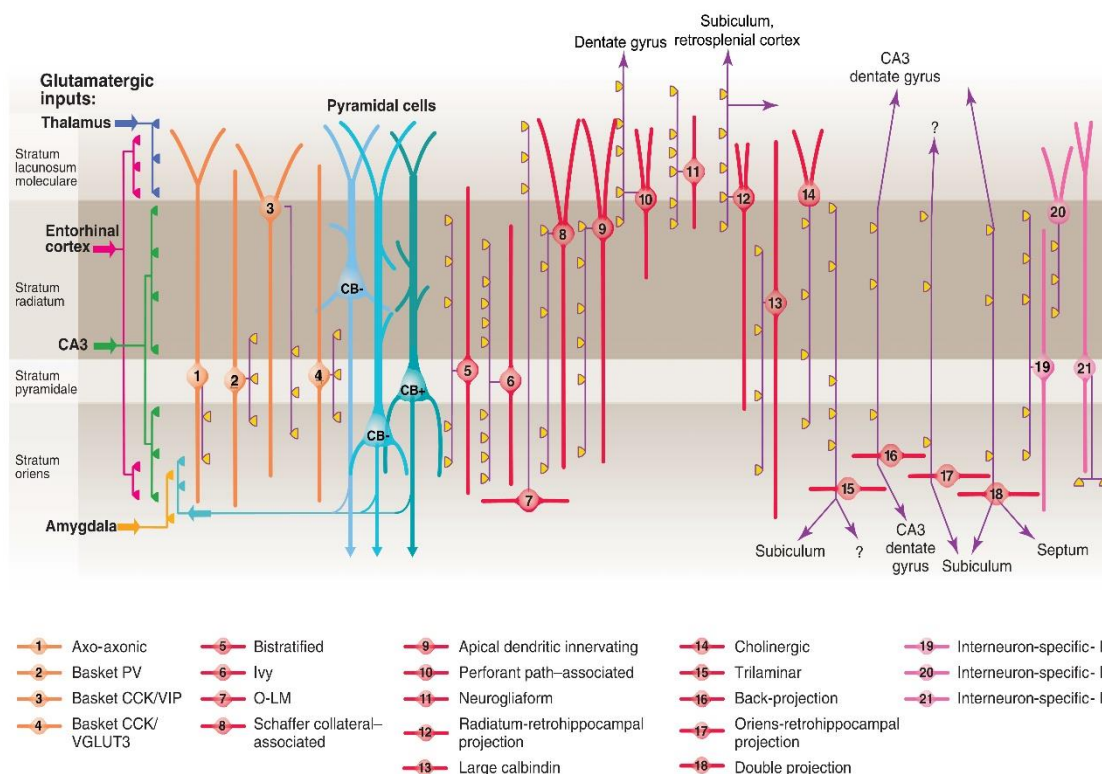
2. ábra A hippocampusz réteges felépítése

Egér hippocampusz koronális metszet NeuN neurális marker elleni immunfestésének konfokális mikroszkóppal készült képe (zöld). Kékkel a sejtmagok vannak jelölve DAPI festéssel. CA1, CA2, CA3 jelöli a hippocampusz régióit, GD a gyrus dentatust. o, CA1 stratum oriens; p, stratum pyramidale; lm, stratum lacunosum moleculare; m, stratum moleculare; g, stratum granulosum; h, hilus (ábra: László Zsófia)

A hippocampusz kapcsolatrendszerében az ún. „triszinaptikus hurok” nagy szerepet játszik. Ennek bemenete az entorhinális kéreg, az onnan érkező perforáns pálya rostjai idegzik be a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek disztális dendritjeit. A szemcsesejt axonjait moharostoknak nevezzük. Ezek innerválják a CA3 régió piramis sejtjeit a stratum lucidum rétegben. A CA3 piramis sejtjei pedig Schaffer-kollaterálisokon keresztül idegzik be a CA1 régió piramis sejtjeit a stratum radiatum és oriens rétegekben. A hippocampusz kimenetét a CA1 piramis sejt axonjai szolgáltatják, melyek főleg a subiculumba és az entorhinális kéregbe tartanak. Ezen kívül például a limbikus rendszer más területeivel, a szeptummal és a szaglógumóval is tart fenn kapcsolatot [14].

A hippocampuszban GABA-erg interneuronok széles spektruma található meg, ezeket sejttestük és efferens szinapszisaik elhelyezkedése, nyúlványaik alakja, az általuk expresszált fehérjék és elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján sorolhatjuk több mint 20 csoportba [17, 18]. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata szempontjából a cholecystokinint

tartalmazó sejtek játszanak fontos szerepet, amelyek axonvégződésein CB₁ receptorok találhatóak [2, 17]. Ilyenek a CCK-t expresszáló kosársejtek, amelyek a piramissejtek sejttestjein vagy proximális dendritjein szinaptizálnak a piramistrétegben; és a dendritikus sejtek, például a Schaffer-kollaterális asszociált sejtek, amelyek a piramissejtek disztális dendritjeit idegzik be a stratum radiatumban, vagy a stratum oriensben; és a perforáns pálya asszociált sejtek, amelyek axonjai a stratum lacunosum-molecularéba futnak, ahol piramissejtekkel szinaptizálnak [18, 19] (3. ábra).



3. ábra A hippocampus CA1 régiójának sejtípusai és azok kapcsolatrendszere [18]

A hippocampus CA1 régiójában a legalább háromféle piramissejt mellett legalább 21 féle interneuron típus található meg. Az ide érkező fő serkentő bemenetek a bal oldalon láthatóak, ezek a thalamus, az enthorinális kéreg, a CA3 régió, az amigdala felől, valamint CA1 piramissejtek axonjairól származnak. A piramissejtek késsel vannak jelölve, a piramissejteket beidegző interneuronok sejttestjei és dendritjei narancssárgák, a főleg más interneuronokkal szinaptizáló interneuronok sejttestjei rózsaszínek. Az axonok lilával, a fő szinaptikus terminációs pontok sárgával vannak jelölve. Az interneuronok esetében az is fel van tüntetve, ha axonjaik más területekre is eljutnak. (ábra: Klausberger és mtsai.)

4. 3. A CB₁ receptorok eloszlása

Az endokannabinoid rendszer egyik kulcseleme, a CB₁ kannabinoid receptor egy G_{i/o}-protein kapcsolt fehérje, amely széles körben fordul elő a központi idegrendszerben. Az agyban a legnagyobb mennyiségben jelen lévő G-protein kapcsolt receptor [20-25]. Legjelentősebb endogén ligandjai az anandamid és a 2-arachidonoyl-glycerol, exogén ligandja például a kender (*Cannabis sativa*) pszichoaktív hatóanyaga, a THC (Δ -9-tetrahidrocannabinol) [22-27]. Előfordulása nem csak az agyterületek szintjén változatos, hanem különböző sejttípusokban is különböző mértékben van jelen. A hippocampusban legnagyobb mennyiségben GABA-erg interneuronok axonterminálisában helyezkedik el [2, 17], ám hatása a szinaptikus erősségre gátló és serkentő szinapszisokban egyaránt igazolt [6, 13]. Ezen túl egyes patofiziológiai folyamatok különbözőképpen változtathatják meg jelenlétét a különböző sejttípusokban. 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 [28]. Nem elég tehát csupán az agyterületre jellemző receptorszám-változást vizsgálni, hanem sejttípus-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 hippocampális gátló interneuronokon [29]. 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 [30]. 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 sejttípus- 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.

4. 4. 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 [31].

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 áteresztőképességű 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 [32].

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 [33]. A klasszikus fluoreszcens mikroszkópiás technikák felbontása azonban jóval elmarad az elektronmikroszkópiától: 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.

Egy optikai rendszer felbontási határa az a távolság, amelynél még éppen képes két ilyen távolságra lévő pont megkülönböztetésére. Bár a geometriai optika szerint különböző lencsék kombinálásával elvileg bármekkora nagyítást el lehet érni, a valóságban a feloldóképesség limitált a fény diffrakciója, azaz szóródása miatt. A fénymikroszkópok által elérhető legkisebb feloldható távolságot az Abbe-elv definiálja (4. ábra).

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

4. ábra Az Abbe-elv alapján definiált legkisebb feloldható távolság (d) [32]

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.

Az Abbe-elv által definiált legkisebb feloldható távolság is csupán ideális optikai körülmények között érhető el, például ha a közeg refraktív indexe homogén, nagy a jelsűrűség és minimális a háttérjel erőssége. A valóságban a képalkotást viszont számos nehézség hátráltatja: optikai aberrációk, a fókuszon kívül eső fényforrások zavaró hatása, az alacsony jel-zaj arány, így nem érhetjük el az elméleti legkisebb felbontási távolságot [32].

A klasszikus fénymikroszkópokkal elérhető jel-zaj arány növelésére viszont 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 [34].

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. A felbontás javítása érdekében egyre kisebb lyukdiafragma alkalmazható, viszont ezáltal egyre több fotont veszítünk, ami csökkentheti a kép kontrasztját [35, 36].

Az Abbe-elv által definiált diffrakciólimit megkerülésére a közelmúltban számos eszközt fejlesztettek, ezeket szuperrezolúciós eljárásoknak nevezzük. A módszerek alapjainak kidolgozásáért ítelték oda a 2014-es kémiai Nobel-díjat.

Közeli és távoli látóterű módszereket különböztetünk meg [37, 38]. A leggyakrabban használt közeli látóterű eljárás a TIRF mikroszkópia, amely a fénysugaraknak a határfelületről való teljes belső visszaverődését használja ki, így elérhető csupán a minta egy nagyon vékony, 100-200 nm vastagságú régiójának megvilágítása. Ezáltal elkerülhető a fókuszon kívüli területekről érkező jelek detektálása, így nő a jel-zaj arány. Ezzel a módszerrel viszont csak a képalkotás axiális felbontása javul [32].

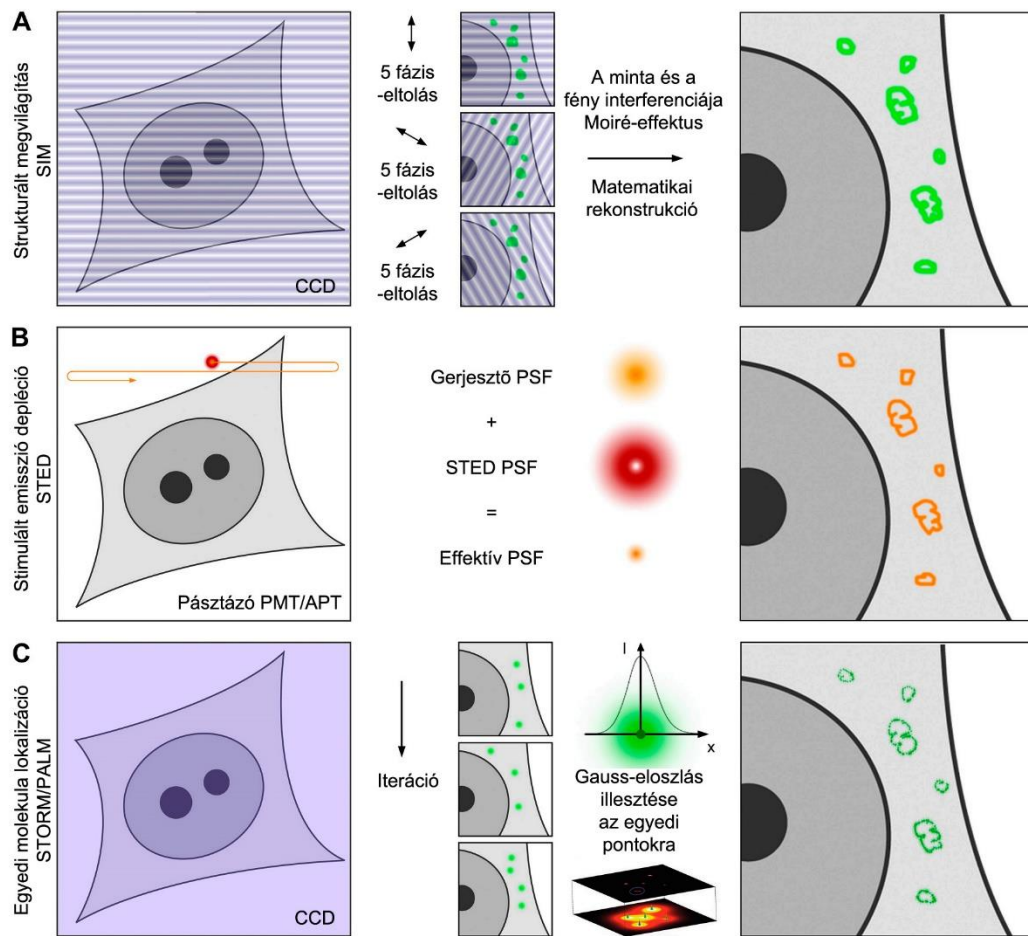
Szintén az előbbi kategóriába tartozik a közeli látóterű pásztázó optikai mikroszkópia (SNOM/NSOM) is, mely objektívlencse nélkül működik, és egy nagyon kis optikai rés segítségével pásztázza végig a mintát. Ebben az esetben a laterális felbontás is javul, ám a képalkotás csupán a minta felszínére korlátozódik [39].

A távoli látóterű módszereket szintén két csoportra oszthatjuk. 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) [40] (5. ábra, 1. táblázat).

A SIM szinuszosan változó mintázatú megvilágítást használ, amelyet optikai rácsra vetített lézerefény segítségével generálnak. Amikor a finom struktúrákat tartalmazó mintával találkozik a szinuszos megvilágítás, interferencia jön létre. A képalkotást különböző irányokból megismétlik, és a végső képet ezek alapján alkotják meg számítógépes visszafejtés segítségével. Ezzel a módszerrel legfeljebb kétszeresére lehet növelni az elérhető diffrakciólimitált felbontást, akár axiális irányban is 3D-SIM alkalmazásával. Gyakorlatilag bármely fluoreszcens festékkel működik, akár többszörös jelölésben is. Hátránya viszont, hogy az eszköz extrém módon érzékeny a képalkotás közben óhatatlanul megjelenő vibrációkra [41, 42].

A STED kétféle megvilágítást használ fel: egy hagyományos, kör alakú pontválasz függvényel rendelkező gerjesztő lézert, és egy toroid (fánk) alakú pontválasz függvényel rendelkező depletáló lézert. Ezek hatásának összegeként egy sokkal kisebb pontválasz függvényel rendelkező megvilágítást lehet kialakítani, mint bármely összetevő esetében, és ez felhasználható a mintában található fluorofórok pásztázására. Így rutinszerűen elérhető akár 30-80 nm-es felbontás is a használt lézerintenzitástól és az alkalmazás idejétől függően. A módszerhez felhasználható fluoreszcens festékek száma korlátozott, tekintettel a gerjesztés és a deplécio komplexitására, viszont kettős immunfestésre és élő anyagról készült képalkotásra alkalmas [43, 44].

Az egyedi molekula lokalizációt felhasználó módszerek azon alapulnak, hogy ha egyszerre csak a fluorofórok kis alcsoportja villan fel véletlenszerűen, akkor azok helyzete egymástól elkülöníthető módon meghatározható. Ezek közül a PALM fotoaktiválható fluoreszcens fehérjéről alkot képet, a STORM pedig fény által ki-be kapcsolható fluoreszcens festékeket használ fel. Az elérhető lokalizációs precizitás a begyűjthető fotonok mennyiségétől függ, 20-30 nm-es is lehet laterális, és 50-80 nm-es axiális irányban. Akár többcsatornás képalkotás is megvalósítható [32].



5. ábra A három legelterjedtebb szuperrezolúciós módszer bemutatása [32]

a) A SIM mikroszkópiában a mintát egy optikai rács által generált szinuszos interferenciaképpel világítják meg, ez a minta diffrakciólimit alatti struktúráival ún. Moiré-mintázatot képez. A nagy térbeli frekvenciájú elemekből így kis térbeli frekvenciájú elemek lesznek, amelyek a CCD kamerával detektálhatóak. A képképzést 15 különböző beállítással végzik el szeletenként, így a matematikai rekonstrukciónak köszönhetően végül kétszeres laterális felbontású kép keletkezik az eredeti széles látóterű felvételhez képest. 3D-SIM esetén az axiális felbontás is megduplázható egy ebben az irányban végbevitt moduláció segítségével.

b) A STED mikroszkópiában a fókuszcsíkot két átlapoló lézernyaláb felhasználásával pásztázzák végig. Míg az első lézer gerjeszti a fluorofórokat, a második, nagyobb hullámhosszú lézer alapállapotba viszi azokat a stimulált emisszió folyamatában. A depletáló lézer toroid (fánk) alakú energia-eloszlást generál, így csupán a minta kis térfogata lesz gerjesztett állapotú, amely kisebb, mint a diffrakciós limit által meghatározott térfogat lenne.

c) Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia azt biztosítja, hogy egyszerre a fluorofórok csupán elenyészően kis részhalmaza van bekapcsolt állapotban. Ezt fotoaktivációval, ki-be kapcsolgatással, triplet állapotban tartással vagy villogtatással lehet elérni. A fluorofórok képe a CCD kamerán diffrakciólimitált foltként jelenik meg, melynek középpontja egy Gauss-eloszlás illesztésével nagy pontossággal meghatározható. A képképzés során több ezer nyers felvétel keletkezik a fényforrások különböző alhalmazairól, ezek segítségével meghatározhatóak a vizsgált struktúrához tartozó fluorofórok. (ábra: Schermelleh és mtsai., módosítva)

1. táblázat A legelterjedtebb szuperrezolúciós képalkotási technikák tulajdonságainak összehasonlítása
(forrás: Schermelleh és mtsai.) [45]

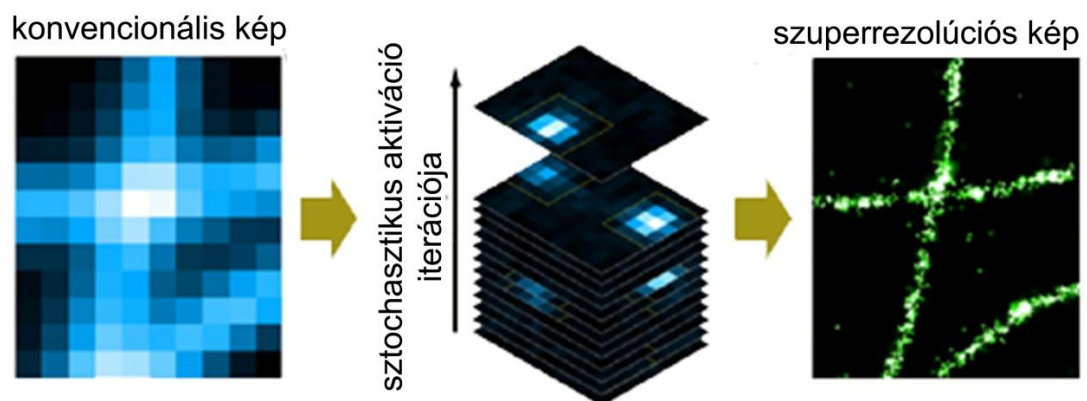
	Közei látóterű			Távoli látóterű	
rövidítés	SNOM/NSOM	TIRFM	SIM	STED	PALM/STORM
detektor	Páztázó PMT/APD	CCD/CMOS	CCD/CMOS	Páztázó PMT/APD	CCD/CMOS
x-y felbontás	20-120 nm	200-300 nm	100-130 nm	20-100 nm	20-50 nm
z felbontás	10 nm	100 nm	250 nm	560-700 nm	20-75 nm
z sorozat készíthető	nem	nem	igen	igen	igen
fluorofórok	bármilyen	bármilyen	bármilyen fotostabil	speciális	speciális
Időbeli felbontás (512x512-es kép)	s-min	ms	ms-s	ms-min	s-min
Élő sejteken alkalmazható	igen	igen	korlátozottan	korlátozottan	korlátozottan
Utófeldolgozást igényel	nem	nem	igen	nem	igen

Mint ahogyan az 1. táblázatból és a módszerek leírásából is látszik, nincsen tökéletes módszer, amely minden előnyös tulajdonságot egyesítene. Tekintettel kutatásunk szempontjából előnyös tulajdonságaira, például az elérhető kitűnő lokalizációs precizításra, a három dimenziós és többcsatornás képalkotásra való használhatóságára, az imént bemutatott módszerek közül mi a STORM mikroszkópiát választottuk a vizsgálatainkhoz, amely megítélésünk szerint a következő években értékes eszközzé válhat a molekuláris neuroanatómusok kezében.

4. 5. A STORM képalkotás

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

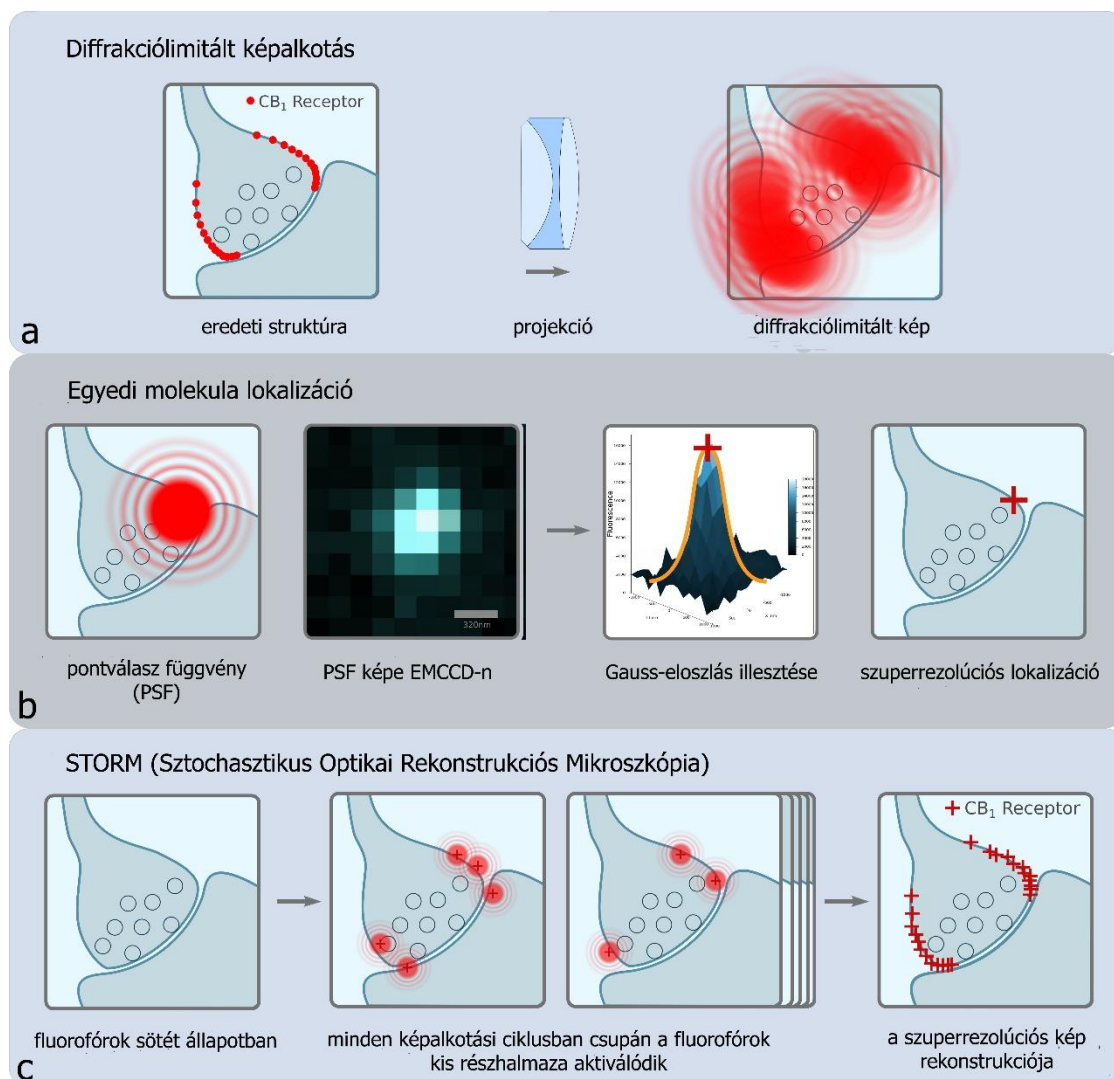
Egy egyedi fluorofór felvillanás helye önmagában nagy pontossággal detektálható, ha elegendő fotont tudunk összegyűjteni, és az egyes felvillanások kellően távol vannak egymástól. Így ha a fluorofórok közül megfelelő hullámhosszú és intenzitású fénnel sikerül egyszerre viszonylag kevés számút felvillantani 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 [46, 47] (6. ábra).



6. ábra A STORM képalkotás [40]

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)

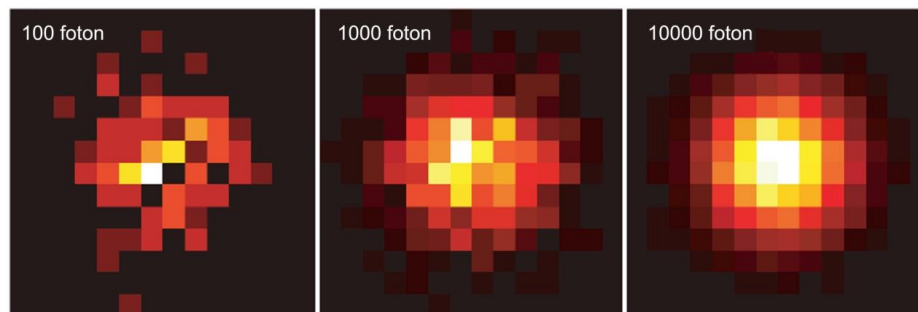
A módszer jól felhasználható az endokannabinoid rendszer molekuláris alkotóelemeinek tanulmányozása során, például a CB₁ kannabinoid receptorok vizsgálatához is (7. ábra).



7. ábra A STORM szuperrezolúciós mikroszkópia működésének elvi alapjai a CB₁ receptor példáján bemutatva

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)

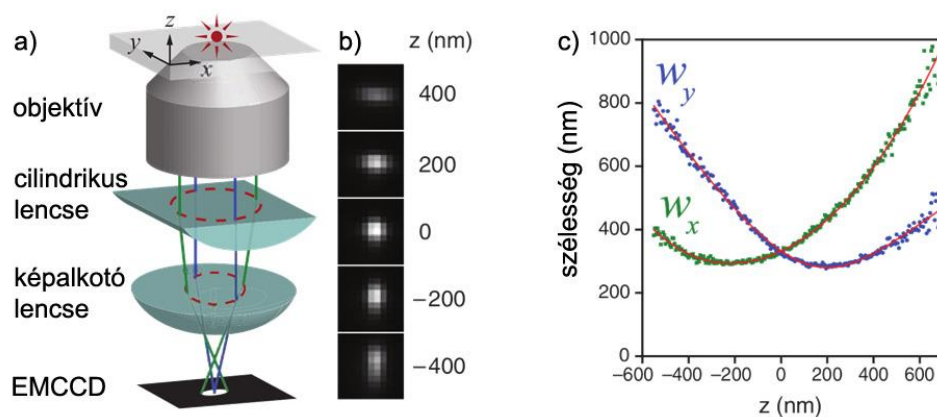
Az egyes fluorofórok helyének meghatározásának pontosságát a lokalizációs precizitással lehet jellemezni. Ez annál nagyobb, minél több fotont képes detektálni a rendszer egy felvillanásból (8. ábra).



8. ábra A STORM jel lokalizációs precizitásának függése a detektált fotonok számától [48]

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)

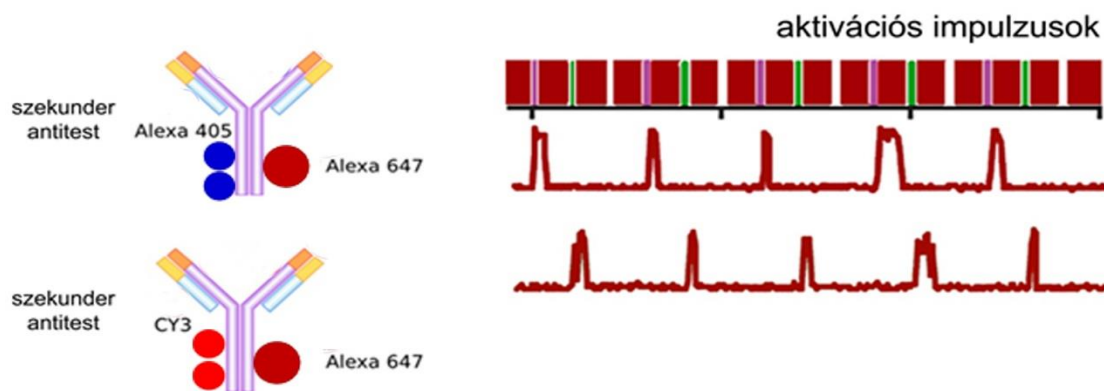
A STORM képalkotás nem csupán egy síkban, hanem három dimenzióban is képes a diffrakciós limitet meghaladó pontossággal meghatározni a felvillanások helyzetét. Ehhez egy cilindrikus lencse behelyezésére van szükség, amely az x vagy y tengely mentén elnyújtja a felvillanások képét attól függően, hogy 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 [49] (9. ábra).



9. ábra 3D STORM képalkotás [49]

- a) A három dimenziós STORM képalkotáshoz egy cilindrikus lencse behelyezése szükséges az objektív és a képalkotó lencse közé.
- b) A cilindrikus lencse az optikai síktól való távolság függvényében megváltoztatja a pontok képének ellipticitását.
- c) Egy fluorofórokat egyetlen síkban tartalmazó minta z-irányú mozgásával 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 [50, 51], illetve a képalkotási körülmények optimalizálásához speciális puffer szükséges [33]. A fluorofórok megfelelő kombinálásával pedig többcsatornás képalkotás is elérhető, így akár több különböző fehérje egyidejű szuperrezolúciós vizsgálata is megoldható [52] (10. ábra).



10. ábra Többcsatornás STORM képalkotás [52]

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 fénnyel 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)

4. 6. 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 [33], 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 kompartment-specifikus 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 [53], QuickPALM [54]), 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 kompartment-specifikus analíziséhez szükség volna ilyen eszközre.

4. 7. Célkitűzés

Diplomamunkámnak 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 hippocampusz 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.

5. A kísérletekhez felhasznált anyagok és eszközök

5. 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 fiziológias 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 újraszeleteltük PB-ben, hogy a STORM képalkotáshoz ideális 20 µm-es vastagságot elérjük.

5. 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-neuroligin-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 [33] 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.

5. 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 szkennervejével, valamint Andor iXon Ultra 897 EMCCD kamerával ellátott Nikon Ti-E invertált mikroszkópot használtunk. A 3D-STORM vizsgálatokat cilindrikus lencse behelyezése biztosította [49]. 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 különbözőségéből 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.

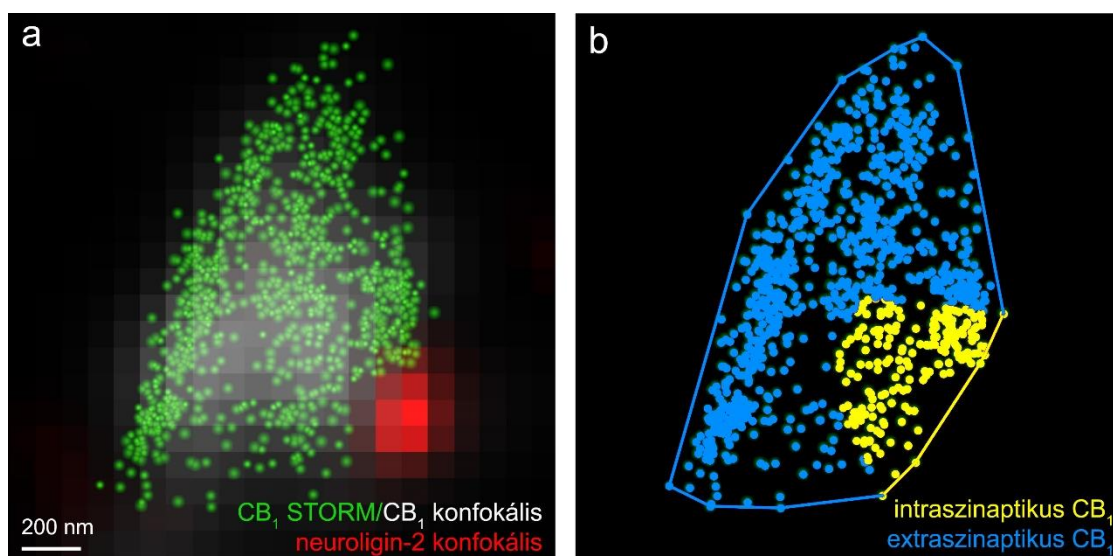
5. 4. Kombinált konfokális/STORM képfeldolgozás

A konfokális képsorozatokon klasszikus maximum likelihood becslő 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 [55]. Minden képre azonos beállításokat alkalmaztunk. A közel kétszáz kép hatékony elemzését Python és AutoHotkey szkriptek segítségével oldottuk meg.

5. 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 esőt 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 (11. ábra). A sűrűségeket a lokalizációs pontok számának és a burkolódarab hosszának hányadosával definiáltuk. A hippocampusz CA1 régiójának piramisrétegében található boutonokat (n=41) vettünk be a vizsgálatba, ezek összesen három állatból származtak.



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

a) Hippokampális CA1 interneuron axonvégződésének anti-CB₁ STORM képe (zöld), és ráillesztve az anti-CB₁ (fehér) és anti-neurologin-2 (piros) festés konfokális képe. A szinapszis helyét a neurologin-2 jel helyzete jelöli.

b) Ugyanazon axonvégződésen a CB₁ 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.

5. 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 teszteket alkalmaztunk a továbbiakban.

Az egyes állatokból származó boutonok adatainak egyesítése nem szignifikáns Kruskal–Wallis teszt után történt meg (bouton terület: $p=0.7402$, bouton CB₁ szám: $p=0.3732$, intraszinaptikus sűrűség: $p=0.6334$, extraszinaptikus sűrűség: $p=0.068$)

A bouton terület és a CB₁ 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.

5. 7. A korrelációs szoftverben használt speciális algoritmusok

5. 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. 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 [56].

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

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

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

12. ábra Az aktív kontúr módszer alapegyenletei [56]

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 (13. 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 [57].

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

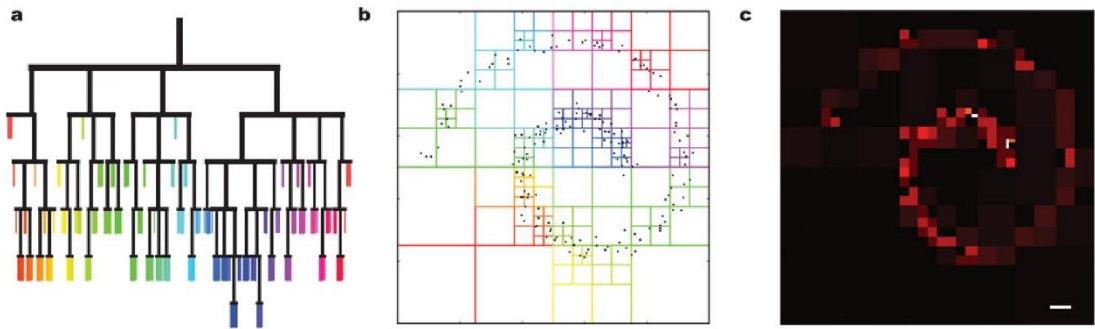
13. ábra Az élmentes morfológiai aktív kontúrok (MACWE) módszer alapegyenlete [57]

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 értékeknek (pl. 1), ha pedig nagyobbakat, akkor ennél nagyobbaknak. 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.

5. 7. 2. Alternatív eszközök STORM koordináták megjelenítésére

Egy nemrégiben megjelent tanulmány [58] szerint a legtöbb lokalizációs mikroszkópai 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.

A problémák megoldására két másik algoritmust ajánlottak [58]. Ezek egyike egy fa alapú algoritmus, amely úgy dolgozik, hogy a tanulmányozott régiót mindig adott számú részre osztja, és vizsgálja a benne lévő lokalizációs pontok számát. Ha egy régióban talált bizonyos számú lokalizációs pontot, akkor azon megismétli a lépést, ha nem, akkor a régió területével arányos módon kiszínezi az adott részt. Így kisebb-nagyobb „pixelekből” álló képet kapunk, amelyből tükröződik a jelölési sűrűség. Ennek hátránya, hogy a struktúra jellegétől függetlenül négyzetekkel történik a reprezentáció.



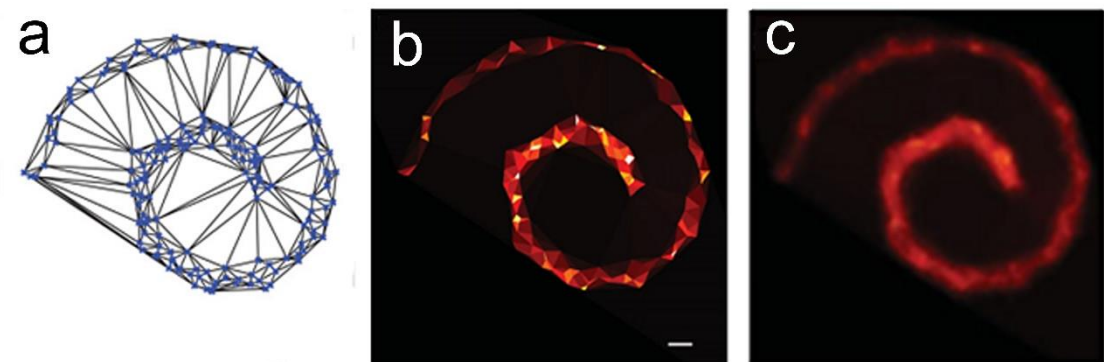
14. ábra Fa alapú vizualizációs módszer bemutatása szimulált spirál pontjain [58]

a) A spirál pontjainak fa reprezentációja, amely az algoritmus alapját képezi. A fa levelei a b) ábrához igazodó módon vannak színezve.

b) A spirál pontjainak ábrázolása a fa módszer segítségével. Az algoritmus mindig négy egyenlő részre osztja a területeket, és ha az alterületekben bizonyos számú pontot talál, akkor azokat tovább osztja rekurzív módon.

c) Az elkészült hisztogramot a „pixelek” mérete alapján színezi: minél kisebb egy terület, annál élénkebben jelenik meg a képen, így biztosítva a struktúra kiemelését. (ábra: Baddeley és mtsai., módosítva)

A másik bemutatott módszer a Delaunay-háromszögelésen alapuló megjelenítés, mely azon alapul, hogy 3-3 lokalizációs pont köré úgy rajzolunk körülírt köröket, hogy ezekbe a körökbe ne essen bele semelyik negyedik pont. Az így kapott ponthármasok lesznek a háromszögek csúcsai. A módszer úgy építi be az egyes pontok mintavételezési sűrűségét, hogy a koordinátaikra 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 (15. ábra) [58].



15. ábra Egyszerű spirál Delaunay-háromszögeléssel nyert képe [58]

a) Egyszerű spirál pontjainak helyzete és a számolt háromszögelés.

b) A háromszögeléssel nyert megjelenített kép. A színkódolás 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.

6. Eredmények

6. 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:

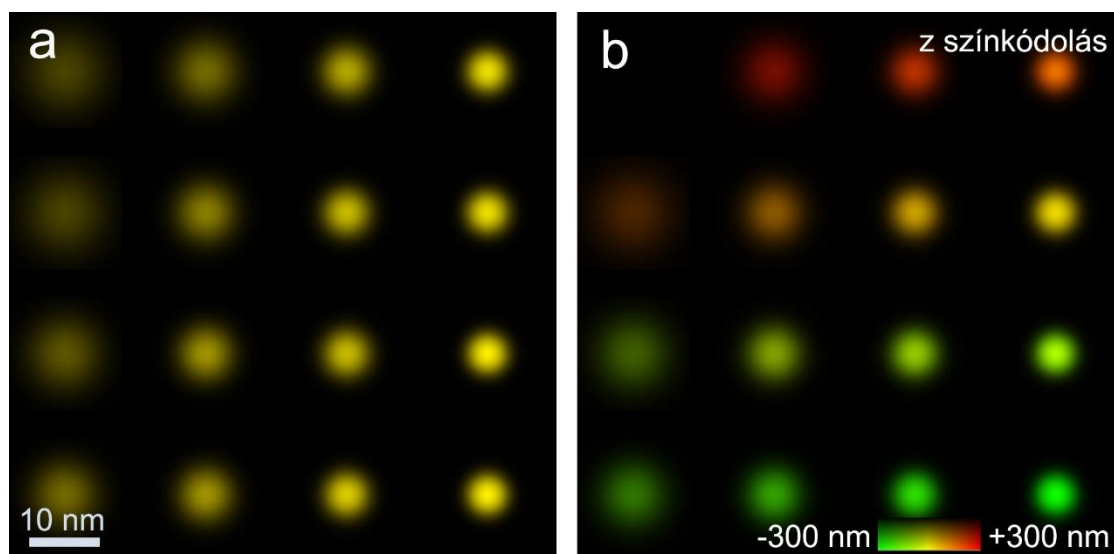
- A szuperrezolúciós képalkotás során használt Nis-Elements (Nikon) szoftver kimeneteként kapott szöveges fájlt használja a STORM adatok megjelenítéséhez, illetve be tudjon olvasni konfokális képalkotási eljárással készült képet és képsorozatot is, ezeket egyidejűleg meg tudja jeleníteni, egymáshoz tudja 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 adatok illesztésére, illetve lokalizációs pontok körülhatárolt csoportjainak szabadkézi, valamint automatikus szegmentációval történő kijelölésére és elkülönítésére, valamint 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.

6. 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 (16. ábra).



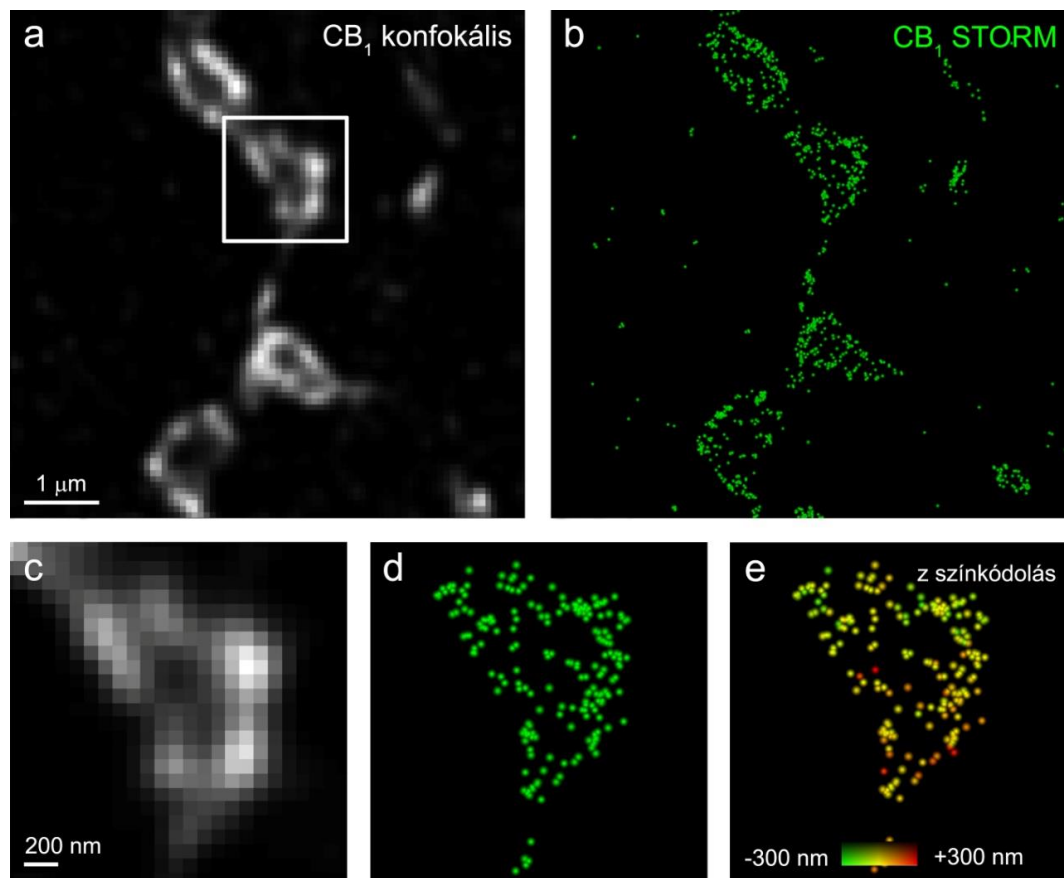
16. ábra STORM koordináta reprezentáció a korrelációs szoftver segítségével

- a) Különböző lokalizációs precizitású pontok vizualizációja. Nagyobb lokalizációs precizitású ponthoz kisebb félértékszélességű, fényesebb Gauss-eloszlás tartozik.
- b) Különböző z-koordinátájú pontok megjelenítése két dimenzióban színekódolás segítségével.

6. 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 17. 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.



17. 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. Mivel a STORM-mal készült képek eltérnek a szokásos pixelintenzitás-alapú képektől, és a lokalizációs pontok koordinátáit tartalmazzák, ezért azokat különböző félértékszélességű Gauss eloszlású felhők szimbolizálják a detekció során beérkező fotonok számának függvényében. Magas lokalizációs precizitáshoz kevésbé szétterjedt, intenzívebb, kisebb félértékszélességű Gauss-eloszlás társul.
- Ugyanazon axon terminális megjelenítése a STORM adatok z koordinátája alapján megvalósított színezéssel.

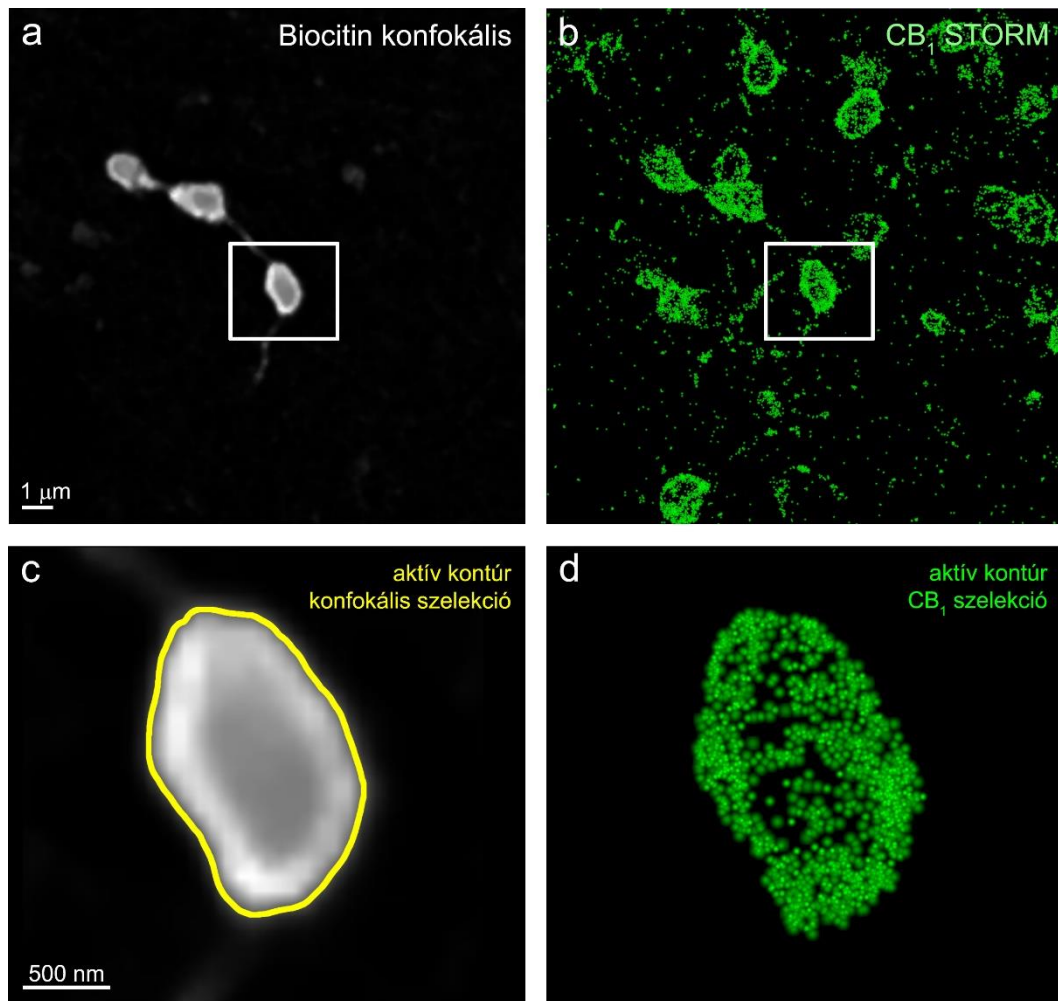
6. 1. 3. Korrelált konfokális és STORM adatok sejtípus- és szubcelluláris domén-specifikus analízise

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 axonvégződéseinek konfokális képén teszteltük. Kiindulási állapotnak olyan köröket választottunk, amelyek tartalmazzák a kiválasztani kívánt struktúrákat, ezekből indítottuk az algoritmust (18. ábra).



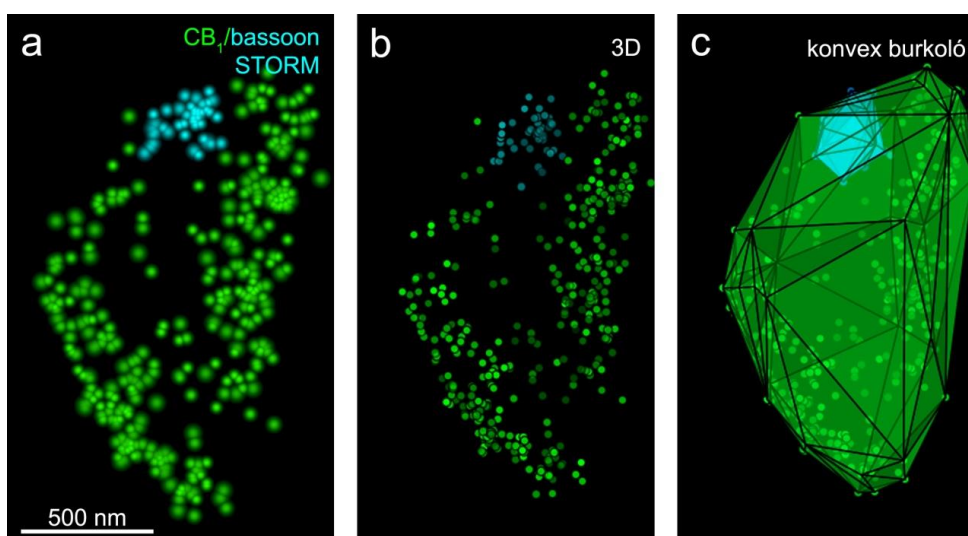
18. ábra Korrelált konfokális és STORM adatok sejt- és szubcelluláris doménspecifikus analízise

- a) Azonosított, biocitinnel töltött hippocampális CA1 interneuron axonterminálisainak dekonvolvált konfokális képe.
- b) Ugyanarról a látótérről 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.

6. 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 [59] (19. ábra).



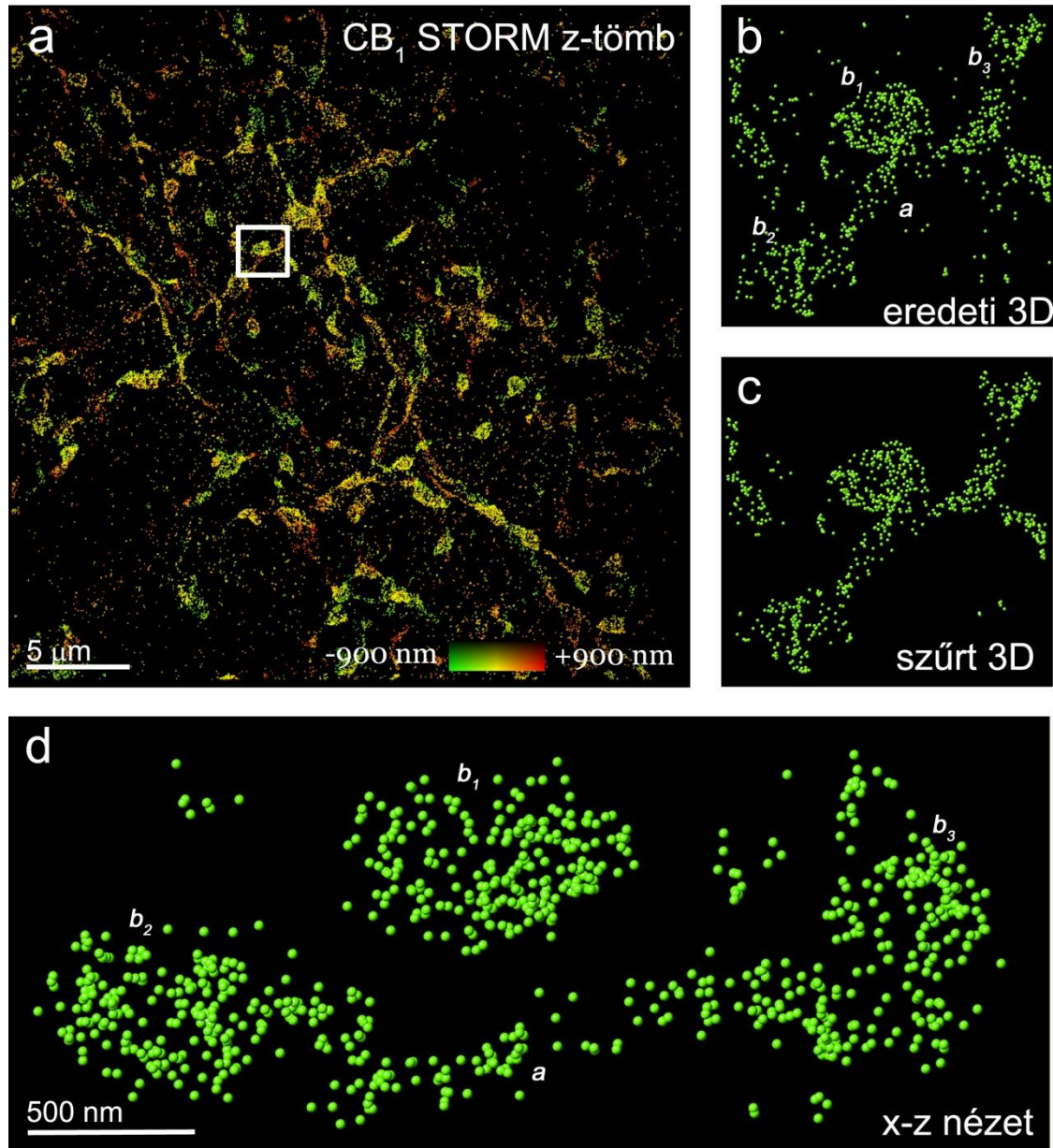
19. ábra STORM adatok három dimenziós megjelenítése

- 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.

6. 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 eltoló felvételekből a szoftverünk segítségével generálhatunk nagyobb mélységet felölelő képet. Négy, 300 nm eltéréssel felvett átfedő adathalmazt használtunk fel, ezeket z-színkódolással ábráztuk. 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 képén x-y irányból bemutatatható, hogy bár ezek

egymáshoz kapcsolódónak látszanak x-y nézetben, egy másik nézetből látszik, hogy ezek valójában egymás alatt helyezkednek el (20. ábra). Az ehhez hasonló térbeli információk gazdagíthatják a különböző analízisek információtartalmát, és rávilágítanak, hogy egyes esetekben nem elégséges a két dimenziós megjelenítés és adatfeldolgozás.



20. ábra Z-tömbök feldolgozása és megjelenítése

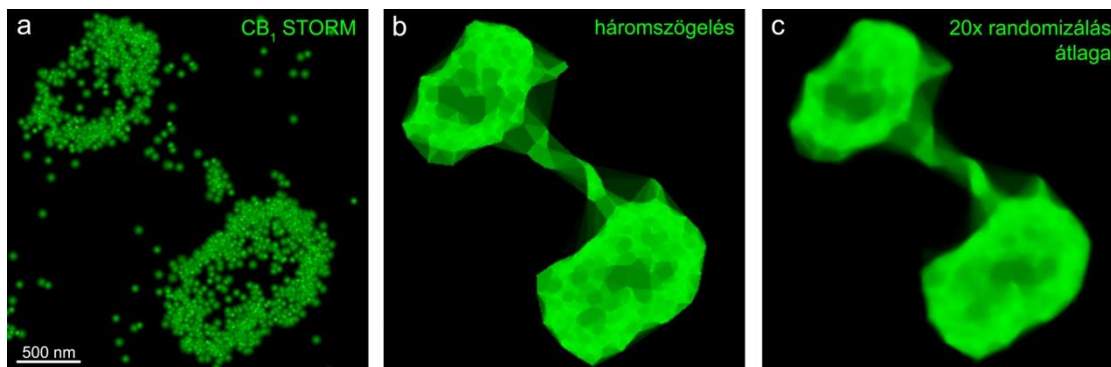
- a) STORM anti-CB₁ immunfestés hippocampusz CA1 régiójáról 4 átfedő, egymástól 300 nm távolságra lévő réteg alapján z-koordináta kódolással.
- b) Egy axon (a) és három axonterminális (b₁, b₂, b₃) 3D reprezentációja x-y nézetből. A struktúrákat CB₁ lokalizációk kis csoportjai veszik körül.
- c) Lokális sűrűség alapú szűrő algoritmus segítségével a kis CB₁ 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 (b₁) az axon fölött helyezkedik el, nem pedig hozzá tartozik.

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

A konvencionális fénymikroszkóptól 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.

Egy nemrégiben megjelent tanulmány vizsgálta a lokalizációs mikroszkópiás adatok megjelenítéséhez használt algoritmusok teljesítményét [58]. Ezek egyike a legnépszerűbb, általunk is használt Gauss-pontokon alapuló algoritmus. A tanulmány azt mutatta meg, hogy bizonyos esetekben a módszer felbontáscsökkenést eredményezhet, mert nem veszi figyelembe a mintavételezés jellegét: a sűrűn mintavételezett területeken nem lehet egymástól elkülöníteni a lokalizációkat, míg a rosszul mintavételezett területeken esetleg a festés hátterét valódi struktúrának vélhetjük. Ezen kívül, mivel jellegében jelentősen eltér a megszokott mikroszkópos képektől, nehezíti a felvételek értelmezését. 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 (21. ábra).



21. ábra Delaunay-háromszögelés felhasználása STORM adatok megjelenítésére

a) Axonvégződések CB₁ STORM képe hippocampusz CA1 régiójából.

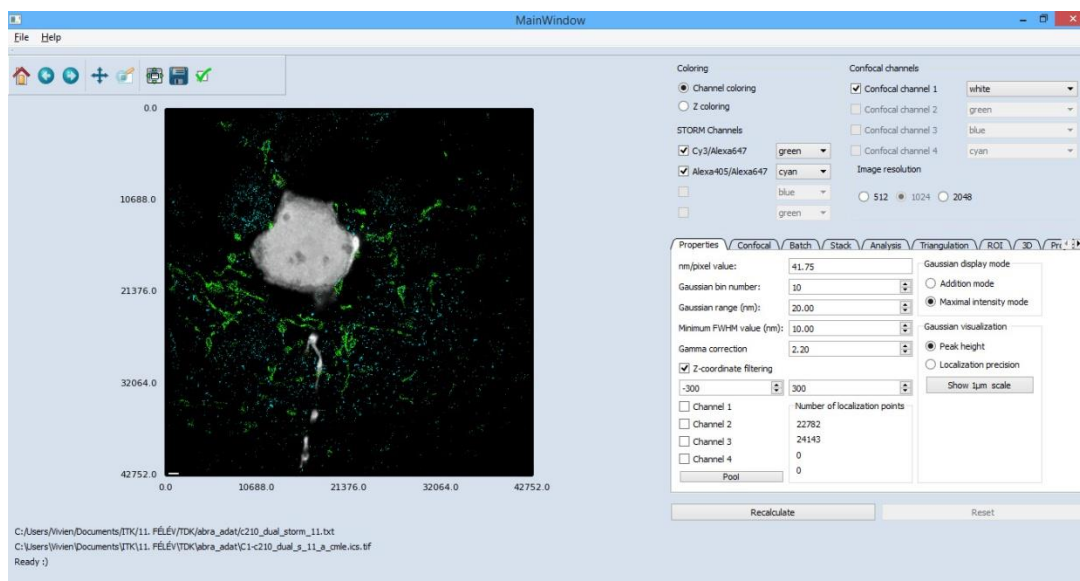
b) STORM adatok Delaunay-háromszögeléssel készített megjelenítése. A háromszögek színezése a leghosszabb oldaluk nagyságával arányos. Minél hosszabb az oldal, annál sötétebb háromszöget kapunk. A koordinátákon lokális sűrűség alapú szűrést is végeztünk az elkülönült lokalizációs pontok eltávolítása érdekében.

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.

6. 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 hajthatóak 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 analízisére, 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 felhasználóknak, így könnyű rajtuk kiigazodni.



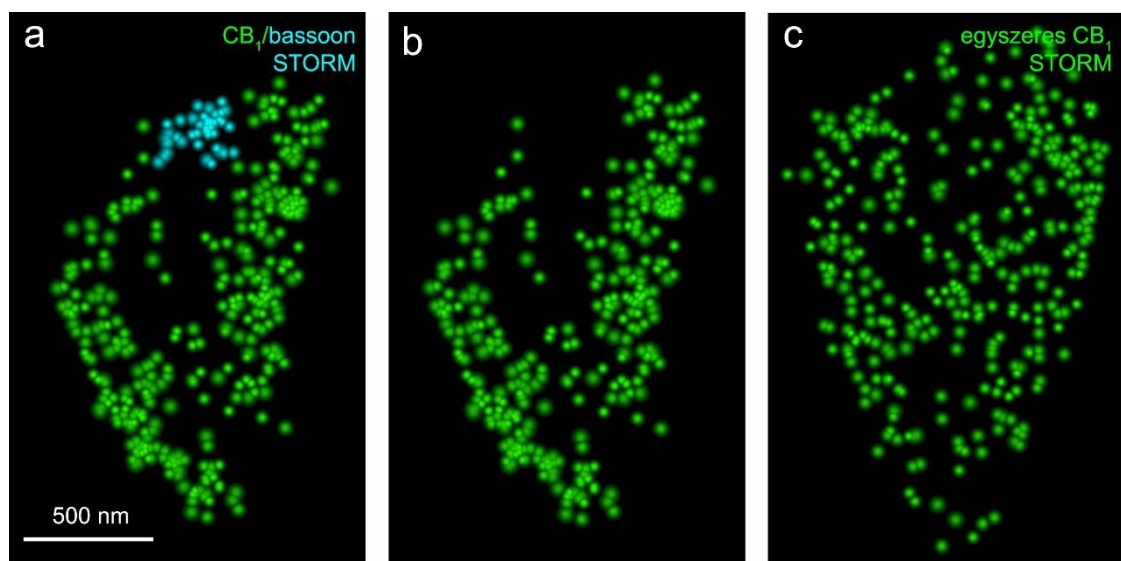
22. ábra A korrelációs szoftver grafikus felhasználói felülete

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.

6. 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 [59]. 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 [60]. Ezen túl az egyszeres CB₁-STORM festésben nem találtunk a kettős festésben megfigyelt nagyarányú CB₁ receptorsűrűség-csökkenéseket (23. ábra).



23. 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 axon terminálisában.

b) Ugyanazon festés csak a CB₁ receptorok ábrázolásával. Az aktív zónában nem látunk receptorokat, így az axonvégződés képen nagyfokú inhomogenitás figyelhető meg.

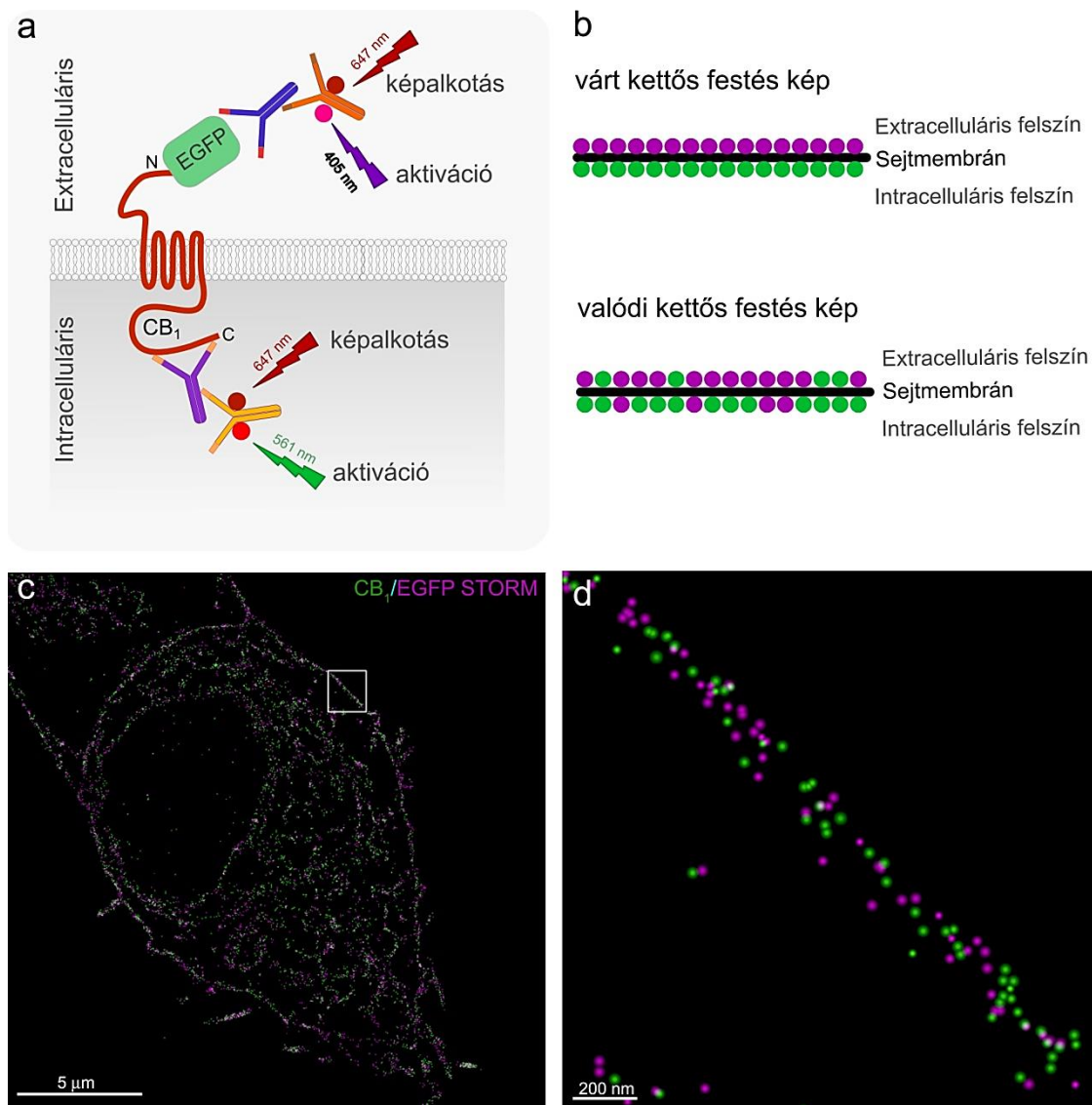
c) Reprezentatív axonvégződés képe CB₁ STORM egyszeres festéssel hippocampális CA1 interneuron axonterminálisában. Az ilyen módszerrel készült képeken általában nem figyelhető meg a b) ábrán mutatott inhomogenitás a bouton területén. (kísérlet: Dudok Barna és Barna László)

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 [52].

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 (24. ábra).



24. 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-terminálisára 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.

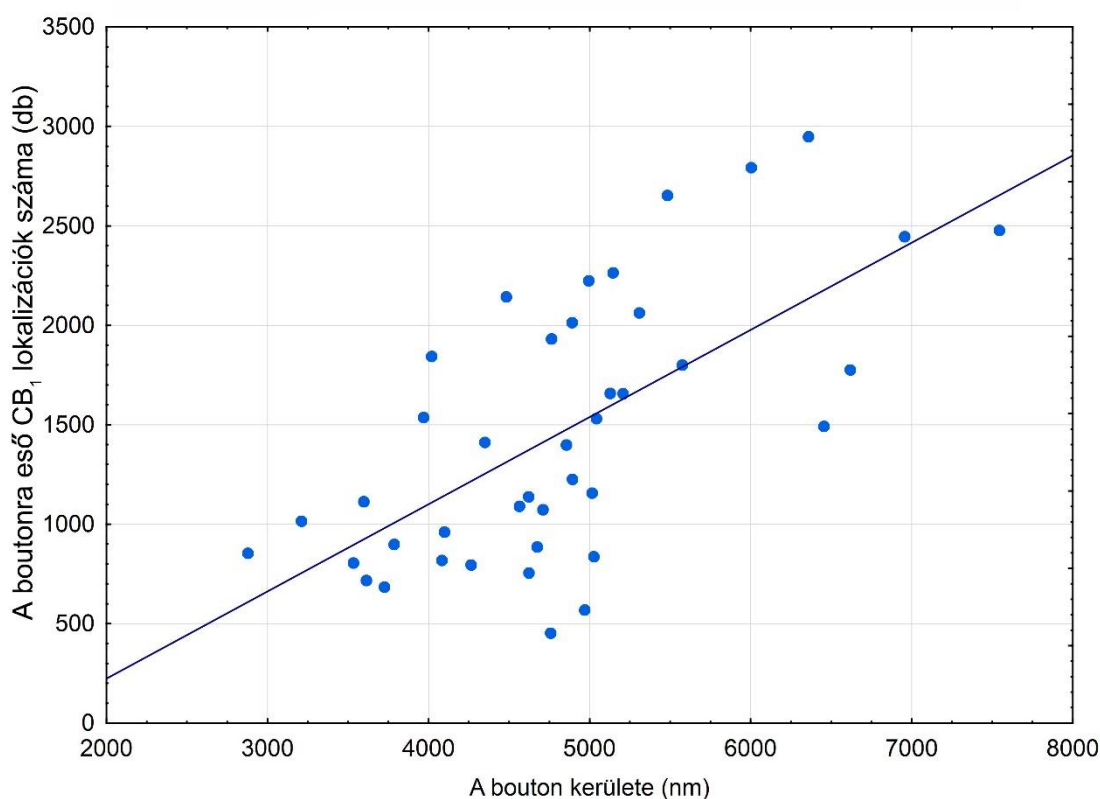
A neuroligin-2 poszt-szinaptikus aktív zóna marker a gátló szinapszisokban [61, 62], így nem lehetséges sztérikus összeférhetetlenség a két típusú antitest számára. Mivel csak egy csatornát

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

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

6. 2. 1 A CB₁ receptorok száma korrelál az axonvégződés méretével

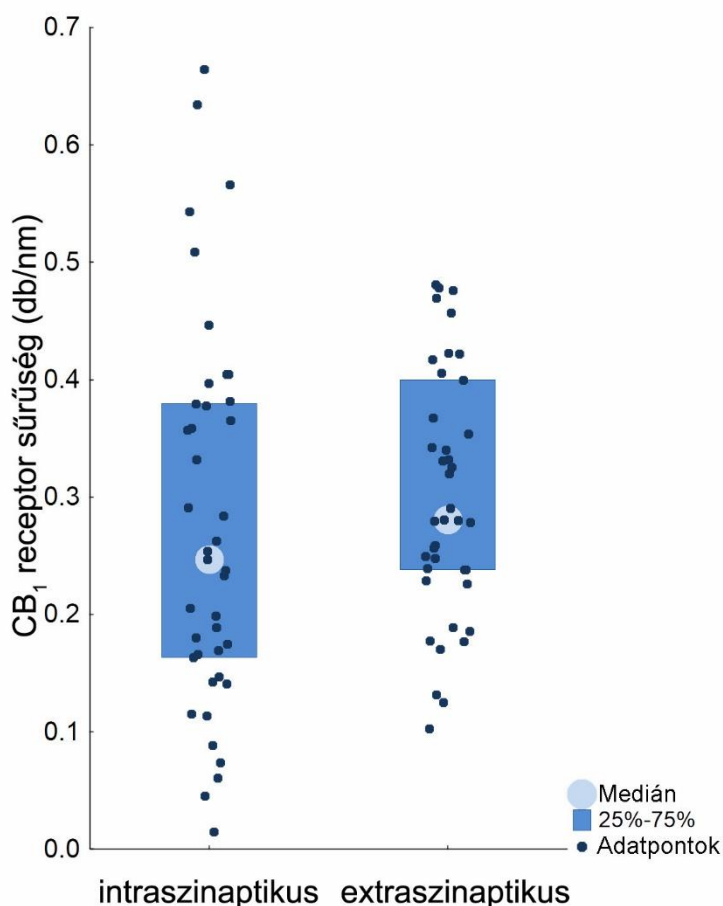
Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy függ-e a CB₁ receptorok száma a bouton méretétől. A konvex burkoló alapján becsült membránhossz meghatározása után azt mutattuk ki, hogy az egyes axonvégződésekben a receptorszám lineáris összefüggést mutat a mérettel (25. ábra). Mivel a CB₁ lokalizációs pontok száma arányos a bouton membránjának hosszával, így a lokalizációs pontok száma osztva a területtel, mint a receptor sűrűséget kifejező mérőszám alkalmazható.



25. ábra A hippocampusz CA1 régiójának piramisrétegében vizsgált axonvégződéseken 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)

6. 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 burkolórészhez 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 kerületdarab 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 (26. 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 neuligin-2 felé eső oldalán történik meg.



26. 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).

7. Diskusszió

7. 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 sejtípus- és sejtspecifikus 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 diplomamunka keretén belül elsőként fejlesztettünk szoftvert ilyen célokra, így lehetőség nyílt adott célfehérjék mennyiségének és elhelyezkedésének nanoskálájú precizitással történő mérésére sejtípus- 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 hajthatóak 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 színkódolással 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 felhatalnáló 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.

7. 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 [63]. 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 axonvégződésein.

Ez azért meglepő, mert a receptor a neurotranszmittert tartalmazó vezikulák membránfúzióját szabályozza feszültségfüggő kalciumcsatornák zárásán keresztül [60], ez a jelenség viszont a szinaptikus zónában történik meg. Korábban a receptor helyzetének vizsgálatában némileg egymásnak ellentmondó eredmények születtek: míg beágyazás utáni elektronmikroszkópos vizsgálatokkal bedúsulást mutattak ki a periszinaptikus zónában hippocampális interneuronok axonvégződésében [29], primer neuronális sejt kultúrában a CB₁ receptorok szabad diffúzióját mutatták meg, vagyis nem találtak specifikus horgonyzó mechanizmust, amely potenciálisan a periszinaptikus zónában tarthatná őket [30]. Az általunk végzett kísérletek adatai az utóbbi álláspontot támogatják. Az ellentét feloldására egy lehetséges magyarázat, hogy az elektronmikroszkópos mérések előkészítése során a minták dehidrációját követően 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 [64-66]. 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 találhatnak helyet maguknak a receptorok véletlenszerű mozgásuk közben. Ennek ellenére nem kizárt, hogy a szinapszis közelében lévő receptor készletnek 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 poszt-szinaptikus 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.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a munkám során nyújtott sok segítséget és útmutatást Dr. Katona Istvánnak, Dudok Barnának, Barna Lászlónak, Pintér Balázsnak, Tischler Erikának, valamint az MTA-KOKI Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoportjának további tagjainak az általuk nyújtott ismeretekért és inspirációért. A Python szoftver fejlesztéséhez nagyon hasznos tanácsokat kaptam Dr. Horváth Andrástól, ezúton is köszönöm. A CB₁ immunfestéshez használt antitestet Masahiko Watanabe (Hokkaidói Egyetem, Sapporo, Japán) biztosította. Ezen kívül szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak a diplomaterv készítése alatt kapott támogatást.

9. Szerzői hozzájárulás

A szerző végezte a CB₁ receptor eloszlására vonatkozó kísérletekben az agyak beágyazását, metszését, az immunfestéseket, a szeletek fedőlemezre való kirakását, a STORM és konfokális képalkotást és képfeldolgozást, a statisztikai analízist és ábrakészítést, valamint a korrelációs szoftver fejlesztését.

Dudok Barna végezte a kísérleti állatok altatását és perfúzióját, valamint a HEK sejtes kísérleteket.

A szoftver funkcióinak bemutatásához használt ábrák nyers adatai Dudok Barna és Barna László munkái, feldolgozásukat a szerző végezte.

10. Irodalomjegyzék

- [1] P. Pacher, S. Batkai, and G. Kunos, "The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy," *Pharmacol Rev*, vol. 58, pp. 389-462, Sep 2006.
- [2] I. Katona, B. Sperlagh, A. Sik, A. Kafalvi, E. S. Vizi, K. Mackie, *et al.*, "Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons," *J Neurosci*, vol. 19, pp. 4544-58, Jun 1 1999.
- [3] I. Katona, G. M. Urban, M. Wallace, C. Ledent, K. M. Jung, D. Piomelli, *et al.*, "Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses," *J Neurosci*, vol. 26, pp. 5628-37, May 24 2006.
- [4] A. I. Gulyas, B. F. Cravatt, M. H. Bracey, T. P. Dinh, D. Piomelli, F. Boschia, *et al.*, "Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala," *Eur J Neurosci*, vol. 20, pp. 441-58, Jul 2004.
- [5] D. Piomelli, "The molecular logic of endocannabinoid signalling," *Nat Rev Neurosci*, vol. 4, pp. 873-84, Nov 2003.
- [6] R. I. Wilson and R. A. Nicoll, "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses," *Nature*, vol. 410, pp. 588-92, Mar 29 2001.
- [7] A. Tanimura, M. Yamazaki, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, S. Kawata, M. Abe, *et al.*, "The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase α mediates retrograde suppression of synaptic transmission," *Neuron*, vol. 65, pp. 320-7, Feb 11 2010.
- [8] I. Katona and T. F. Freund, "Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease," *Nat Med*, vol. 14, pp. 923-30, Sep 2008.
- [9] R. Nyilas, L. C. Gregg, K. Mackie, M. Watanabe, A. Zimmer, A. G. Hohmann, *et al.*, "Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia," *Eur J Neurosci*, vol. 29, pp. 1964-78, May 2009.
- [10] A. Ludanyi, L. Eross, S. Czirjak, J. Vajda, P. Halasz, M. Watanabe, *et al.*, "Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus," *J Neurosci*, vol. 28, pp. 2976-90, Mar 19 2008.
- [11] N. D. Volkow, R. D. Baler, W. M. Compton, and S. R. Weiss, "Adverse health effects of marijuana use," *N Engl J Med*, vol. 370, pp. 2219-27, Jun 5 2014.

- [12] D. M. Lovinger, "Presynaptic modulation by endocannabinoids," *Handb Exp Pharmacol*, vol. 184, pp. 435-77, 2008.
- [13] T. Ohno-Shosaku, T. Maejima, and M. Kano, "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals," *Neuron*, vol. 29, pp. 729-38, Mar 2001.
- [14] J. Szentágothai and M. Réthelyi, *Funkcionális anatómia III.*, nyolcadik, átdolgozott és bővített kiadás Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt., 2006.
- [15] J. O'Keefe and J. Dostrovsky, "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat," *Brain Research*, vol. 34, pp. 171-175, 1971.
- [16] P. Andersen, *The Hippocampus Book*: Oxford University Press, USA, 2007.
- [17] P. Somogyi and T. Klausberger, "Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus," *J Physiol*, vol. 562, pp. 9-26, Jan 1 2005.
- [18] T. Klausberger and P. Somogyi, "Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations," *Science*, vol. 321, pp. 53-7, Jul 4 2008.
- [19] D. W. Cope, G. Maccaferri, L. F. Marton, J. D. Roberts, P. M. Cobden, and P. Somogyi, "Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus," *Neuroscience*, vol. 109, pp. 63-80, 2002.
- [20] L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, and T. I. Bonner, "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA," *Nature*, vol. 346, pp. 561-4, Aug 9 1990.
- [21] W. A. Devane, F. A. Dysarz, 3rd, M. R. Johnson, L. S. Melvin, and A. C. Howlett, "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain," *Mol Pharmacol*, vol. 34, pp. 605-13, Nov 1988.
- [22] W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, *et al.*, "Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor," *Science*, vol. 258, pp. 1946-1949, Dec 18 1992.
- [23] A. Ameri, "The effects of cannabionoids on the brain," *Prog Neurobiol*, vol. 58, pp. 315-348, 1999.
- [24] T. F. Freund, I. Katona, and D. Piomelli, "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling," *Physiol Rev*, vol. 83, pp. 1017-66, Jul 2003.
- [25] A. C. Howlett, "The cannabinoid receptors," *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, vol. 68-9, pp. 619-631, Aug 2002.

- [26] D. Piomelli, M. Beltramo, A. Giuffrida, and N. Stella, "Endogenous cannabinoid signaling," *Neurobiol Dis*, vol. 5, pp. 462-73, Dec 1998.
- [27] N. Stella, P. Schweitzer, and D. Piomelli, "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation," *Nature*, vol. 388, pp. 773-778, Aug 21 1997.
- [28] K. Chen, A. Ratzliff, L. Hilgenberg, A. Gulyas, T. F. Freund, M. Smith, *et al.*, "Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures," *Neuron*, vol. 39, pp. 599-611, Aug 14 2003.
- [29] G. Nyiri, C. Cserep, E. Szabadits, K. Mackie, and T. F. Freund, "CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons," *Neuroscience*, vol. 136, pp. 811-22, 2005.
- [30] L. Mikasova, L. Groc, D. Choquet, and O. J. Manzoni, "Altered surface trafficking of presynaptic cannabinoid type 1 receptor in and out synaptic terminals parallels receptor desensitization," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 18596-601, Nov 25 2008.
- [31] J. D. Pollock, D. Y. Wu, and J. S. Satterlee, "Molecular neuroanatomy: a generation of progress," *Trends Neurosci*, vol. 37, pp. 106-23, Feb 2014.
- [32] L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt, "A guide to super-resolution fluorescence microscopy," *J Cell Biol*, vol. 190, pp. 165-75, Jul 26 2010.
- [33] A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, and X. Zhuang, "Superresolution imaging of chemical synapses in the brain," *Neuron*, vol. 68, pp. 843-56, Dec 9 2010.
- [34] W. Wallace, L. H. Schaefer, and J. R. Swedlow, "A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy," *Biotechniques*, vol. 31, pp. 1076-8, 1080, 1082 passim, Nov 2001.
- [35] C. Cremer and T. Cremer, "Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field," *Microsc Acta*, vol. 81, pp. 31-44, Sep 1978.
- [36] R. Heintzmann, V. Sarafis, P. Munroe, J. Nairn, Q. S. Hanley, and T. M. Jovin, "Resolution enhancement by subtraction of confocal signals taken at different pinhole sizes," *Micron*, vol. 34, pp. 293-300, 2003.
- [37] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, and S. W. Hell, "Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 17565-9, Dec 6 2005.
- [38] S. W. Hell, "Far-field optical nanoscopy," *Science*, vol. 316, pp. 1153-8, May 25 2007.
- [39] E. Betzig and J. K. Trautman, "Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit," *Science*, vol. 257, pp. 189-195, July 10, 1992 1992.

- [40] B. Huang, H. Babcock, and X. Zhuang, "Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells," *Cell*, vol. 143, pp. 1047-58, Dec 23 2010.
- [41] M. G. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, *et al.*, "Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination," *Biophys J*, vol. 94, pp. 4957-70, Jun 2008.
- [42] M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *Journal of Microscopy-Oxford*, vol. 198, pp. 82-87, May 2000.
- [43] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated-Emission - Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy," *Optics Letters*, vol. 19, pp. 780-782, Jun 1 1994.
- [44] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell, "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, pp. 8206-10, Jul 18 2000.
- [45] Y. Fukudome, T. Ohno-Shosaku, M. Matsui, Y. Omori, M. Fukaya, H. Tsubokawa, *et al.*, "Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling," *Eur J Neurosci*, vol. 19, pp. 2682-92, May 2004.
- [46] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat Methods*, vol. 3, pp. 793-5, Oct 2006.
- [47] J. C. Vaughan, S. Jia, and X. Zhuang, "Ultrabright photoactivatable fluorophores created by reductive caging," *Nat Methods*, vol. 9, pp. 1181-4, Dec 2012.
- [48] A. L. McEvoy, D. Greenfield, M. Bates, and J. Liphardt, "Q&A: Single-molecule localization microscopy for biological imaging," *BMC Biol*, vol. 8, p. 106, 2010.
- [49] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science*, vol. 319, pp. 810-3, Feb 8 2008.
- [50] G. T. Dempsey, M. Bates, W. E. Kowtoniuk, D. R. Liu, R. Y. Tsien, and X. Zhuang, "Photoswitching mechanism of cyanine dyes," *J Am Chem Soc*, vol. 131, pp. 18192-3, Dec 30 2009.
- [51] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, and X. Zhuang, "Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging," *Nat Methods*, vol. 8, pp. 1027-36, Dec 2011.

- [52] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, and X. Zhuang, "Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes," *Science*, vol. 317, pp. 1749-53, Sep 21 2007.
- [53] S. Wolter, A. Loschberger, T. Holm, S. Aufmkolk, M. C. Dabauvalle, S. van de Linde, *et al.*, "rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy," *Nat Methods*, vol. 9, pp. 1040-1, Nov 2012.
- [54] R. Henriques, M. Lelek, E. F. Fornasiero, F. Valtorta, C. Zimmer, and M. M. Mhlanga, "QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ," *Nat Methods*, vol. 7, pp. 339-40, May 2010.
- [55] H. Babcock, Y. M. Sigal, and X. Zhuang, "A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy," *Optical Nanoscopy*, vol. 1, 2012.
- [56] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos, "Snakes - Active Contour Models," *International Journal of Computer Vision*, vol. 1, pp. 321-331, 1987.
- [57] P. Marquez-Neila, L. Baumela, and L. Alvarez, "A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces," *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 36, pp. 2-17, Jan 2014.
- [58] D. Baddeley, M. B. Cannell, and C. Soeller, "Visualization of localization microscopy data," *Microsc Microanal*, vol. 16, pp. 64-72, Feb 2010.
- [59] S. T. Dieck, L. Sanmarti-Vila, K. Langnaese, K. Richter, S. Kindler, A. Soyke, *et al.*, "Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals," *Journal of Cell Biology*, vol. 142, pp. 499-509, Jul 27 1998.
- [60] R. I. Wilson, G. Kunos, and R. A. Nicoll, "Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus," *Neuron*, vol. 31, pp. 453-62, Aug 16 2001.
- [61] F. Varoquaux, S. Jamain, and N. Brose, "Neuroigin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses," *Eur J Cell Biol*, vol. 83, pp. 449-56, Sep 2004.
- [62] V. T. Takacs, T. F. Freund, and G. Nyiri, "Neuroigin 2 is expressed in synapses established by cholinergic cells in the mouse brain," *PLoS One*, vol. 8, p. e72450, 2013.
- [63] B. Dudok, L. Barna, M. Ledri, S. I. Szabo, E. Szabadits, B. Pinter, *et al.*, "Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling," *Nat Neurosci*, doi: 10.1038/nn.3892, 12/08/online 2014.
- [64] A. A. Coutts, S. Anavi-Goffer, R. A. Ross, D. J. MacEwan, K. Mackie, R. G. Pertwee, *et al.*, "Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons," *J Neurosci*, vol. 21, pp. 2425-33, Apr 1 2001.

- [65] W. Jin, S. Brown, J. P. Roche, C. Hsieh, J. P. Cerver, A. Kooor, *et al.*, "Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization," *J Neurosci*, vol. 19, pp. 3773-80, May 15 1999.
- [66] C. Foldy, A. Neu, M. V. Jones, and I. Soltesz, "Presynaptic, activity-dependent modulation of cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of GABA release," *J Neurosci*, vol. 26, pp. 1465-9, Feb 1 2006.