

PROJEKCYJNE MAPOWANIE AKTYWNOŚCI ZA POMOCĄ PLATFORMY MIRA (Multimodal Image Registration and Analysis)



Rysunek 1. Schemat strategii podświetlania odczynników stosowanych do identyfikacji wybranych projekcji. Wszystkie neurony są znakowane wskaźnikiem GCaMP wraz z subpopulacją komórek specyficznych oznaczonych czerwonym wskaźnikiem statycznym.



Rysunek 2. Adapter konfokalny MIRA z dołączonym miniskopem Inscopix (system nVistaTM lub nVokeTM sprzedawany oddzielnie).

Wprowadzenie

Miniskopy Inscopix (systemy nVistaTM lub nVokeTM) umożliwiają neuronaukowcom rejestrowanie oraz manipulowanie wielkoskalowej dynamiki wapniowej na poziomie rozdzielczości pojedynczej komórki w genetycznie zdefiniowanych populacjach neuronów u swobodnie poruszających się zwierząt przez okres wielu miesięcy. Posiada to kluczowe znaczenie dla zrozumienia oraz zanalizowania korelacji przyczynowo-skutkowej pomiędzy obwodami neuronowymi, a zachowaniem zwierząt. Niemniej jednak, oprócz rejestrowania aktywności dynamiki obwodów neuronowych, niezmiernie istotne jest również zrozumienia fundamentalnej natury badanych komórek. Nasza firma opracowała platformę MIRA tj. Multimodalną Rejestrację oraz Analizę Obrazu (z ang. Multimodal Image Registration and Analysis), która w pełni integruje obrazowanie wapnia przy użyciu zminiaturyzowanych mikroskopów wraz z laserowymi mikroskopami skaningowymi o wysokiej rozdzielczości (LSM; mikroskopy konfokalne lub wielofotonowe). Dodatkowo, system posiada szybki proces akwizycji oraz analizy danych, który jest dostosowany do ko-rejestrowania obrazów z obydwóch modułów, dzięki czemu pozwala to na pogłębienie naszej wiedzy na temat biologicznych mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania i zachowania mózgu.

Łączenie danych z dwóch różnych modułów

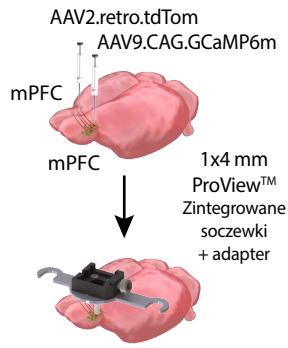
Platforma MIRA pozwala naukowcom jednocześnie rejestrować, dopasowywać oraz korelować zmiany w dynamice obwodów neuronalnych zachodzące w konkretnych komórkach (przy użyciu miniskopu Inscopix), a także obserwować zmiany w innych typach komórek (za pomocą LSM) w tym samym polu widzenia. Platforma MIRA umożliwia szereg zastosowań, w tym wspólną rejestrację komórek GCaMP oraz neuronów specyficznych dla danej projekcji, które zostały oznaczone wskaźnikiem statycznym, takim jak tdTomato lub mCherry (Rysunek 1). Aby uzyskać informacje o wszystkich aplikacjach obsługiwanych przez platformę MIRA, [odwiedź stronę internetową INSCOPIX](#).

Materiały oraz zaopatrzenie do platformy MIRA

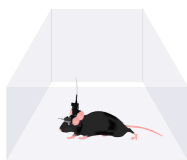
System MIRA składa się z adaptera optomechanicznego (Rysunek 2), szkiełka kalibracyjnego oraz oprogramowania Inscopix do zapisywania i analizy danych. Ko-rejestrację komórek można przeprowadzić w prosty sposób w momencie, gdy platforma MIRA jest sparowana z naszymi zintegrowanymi soczewkami implantacyjnymi wraz z adapterem na głowę przeznaczonym do obrazowania pracy mózgu u zwierząt. Pozostałe, niezbędne materiały to:

- Instrument stereotaktyczny
- Pompa mikroiniekcyjna
- System nVista lub nVoke
- Mikroskop LSM (ZEISS LSM model 880 lub 980; sprzedawany oddzielnie)
- Myszy GCaMP lub dzikie (WT)*
- Statyczny wskaźnik do wyboru*
- Wskaźnik GCaMP*
- Cement dentystyczny lub klej (do wyboru)

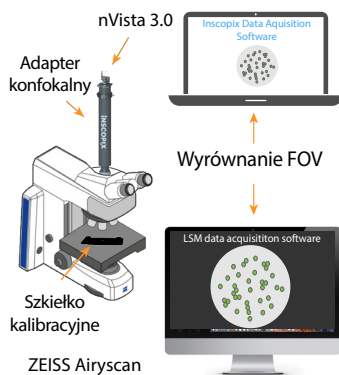
A Przygotowanie zwierząt



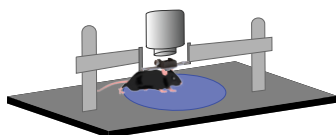
B Miniskop do obrazowania swobodnie poruszających się zwierząt



C Kalibracja MIRA oraz wyrównanie FOV



D Obrazowanie unieruchomionej głowy za pomocą czujnika Airyscan



Rysunek 3. Schemat pracy z platformą MIRA.

Ogólny przebieg eksperymentu (Rysunek 3; protokół skrócony)

A. Przygotowanie zwierząt

1. Ustal konstrukcję wirusa, współrzędne docelowe, a także objętość oraz szybkość wstrzykiwania, aby móc oznaczyć komórki będące przedmiotem badań.
2. Przygotuj zwierzę do stereotaktycznego zabiegu chirurgicznego.
3. Wstrzyknij wskaźniki w docelowe obszary mózgu za pomocą mikropompy, a następnie zszyj skórę głowy i zezwól zwierzęciu na odpowiednią rekonwalescencję.
4. W tym samym lub w oddzielnym pomieszczeniu przygotuj zwierzę do stereotaktycznej procedury instalacji zintegrowanej soczewki.
5. Wykonaj kraniotomię w celu uzyskania jak najlepszego dostępu do docelowego obszaru mózgu dla sondy zintegrowanej soczewki wraz z adapterem na głowę.
6. Powoli opuść sondę do wnętrza mózgu, aż do osiągnięcia pożądanej głębokości w oparciu o wybrane współrzędne. Przed wprowadzeniem sondy możliwa jest konieczność odsunięcia tkanek leżących powyżej docelowego obszaru mózgu.
7. Użyj wybranego kleju, aby prawidłowo zamontować zintegrowaną soczewkę do czaszki zwierzęcia.
8. Przenieś zwierzę do klatki domowej i zastosuj środki przeciwbólowe (zgodnie z ogólnymi wytycznymi) i zezwól zwierzęciu na odpowiednią rekonwalescencję.

B. Obrazowanie swobodnie poruszających się zwierząt za pomocą miniskopu

1. Przygotuj miniskop oraz system DAQ do akwizycji danych. Upewnij się, że posiadasz wystarczająco dużo miejsca na dysku na wybraną sesję rejestracji.
2. U znieczulonych zwierząt lub tuż po wybudzeniu pooperacyjnym, należy zdjąć osłonę płytki na głowie, a następnie zamocować miniskop.
3. Umieść zwierzę z zamontowanym miniskopem w wybranej klatce behawioralnej. Pozwól zwierzęciu na chwilę odpoczynku po znieczuleniu lub po operacji, a następnie rozpocznij eksperyment.

C. Kalibracja MIRA oraz wyrównanie FOV

1. Zamontuj adapter konfokalny Inscopix na czujniku Airyscan oraz zamocuj miniskop na adapterze za pomocą śrubokrętu ProView.
2. Zlokalizuj kulki fluorescencyjne na szkiełku kalibracyjnym Inscopix za pomocą Airyscan, a następnie wykonaj zdjęcie migawkowe za pomocą oprogramowania Airyscan.
3. Dostosuj stolik miniskopu na adapterze konfokalnym tak, aby ustawić odpowiednią ostrość próbki na szkiełku kalibracyjnym przy zamontowanym miniskopie. Wykonaj zdjęcie za pomocą miniskopu oraz oprogramowania Inscopix Data Acquisition Software.
Po uchwyceniu obydwóch obrazów, systemy zostaną sparowane, a otrzymany obraz będzie od teraz parafokalny (czyli będzie utrzymany w tej samej płaszczyźnie Z).

D. Obrazowanie za pomocą czujnika Airyscan

1. Przygotuj zwierzę do eksperymentu poprzez unieruchomienie głowy za pomocą specjalnego adaptera.
2. Zdejmij pokrywę płytki podstawowej, a następnie umieść zwierzę pod obiektywem Airyscan.
3. Wyrównaj pozycję FOV u swobodnie poruszającego się zwierzęcia za pomocą adaptera konfokalnego miniskopu.
4. Zapisz zestaw danych za pomocą Airyscan.
5. Ustaw oś Z dla obydwóch kanałów (czerwonego i zielonego) za pomocą Airyscan.

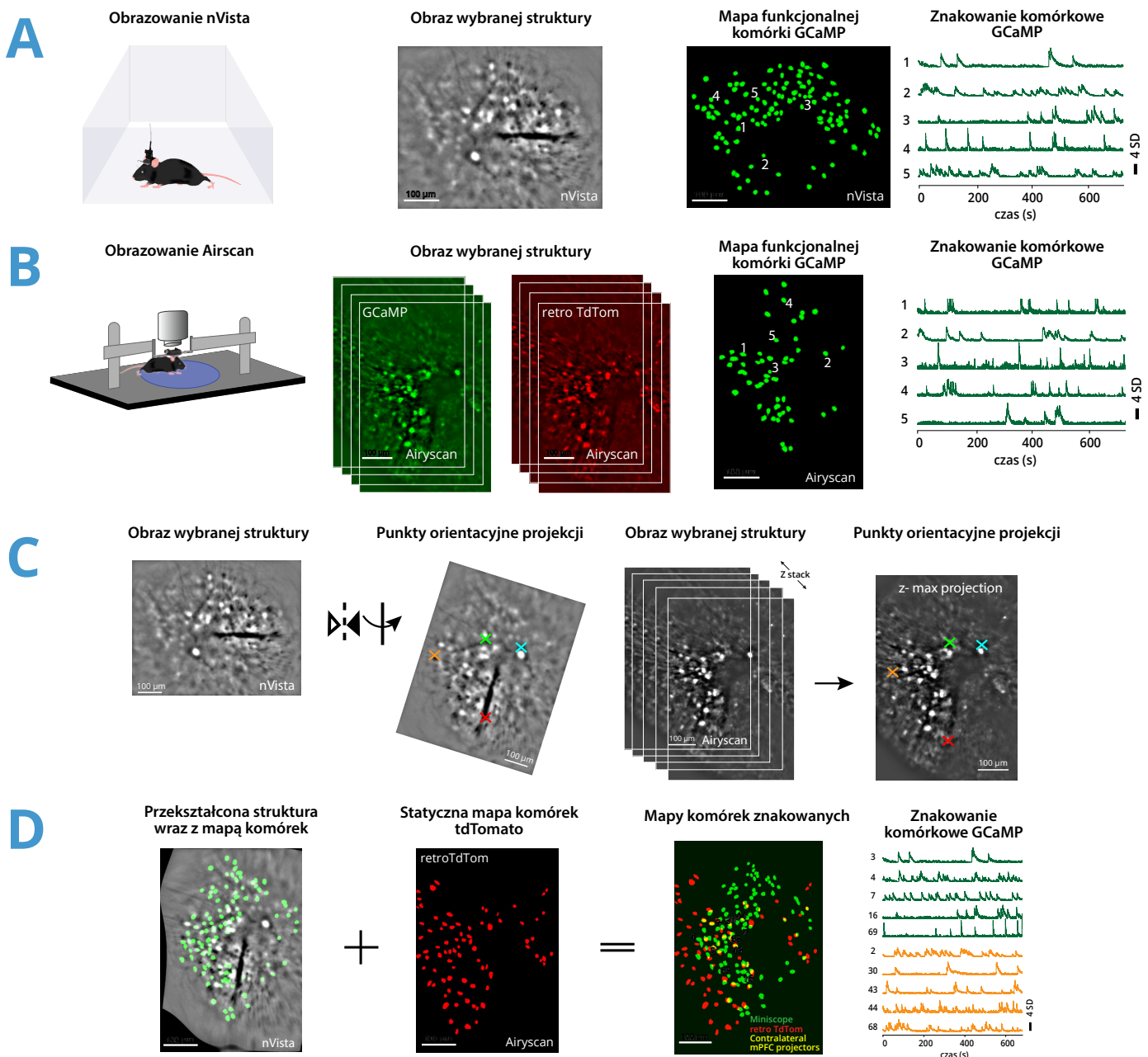
Analiza danych oraz wyniki

Obrazowanie kontralateralnych neuronów projekcyjnych

W tym badaniu, wszystkie neurony zostały oznaczone znacznikiem GCaMP w przyśrodkowej korze przedczołowej myszy (mPFC), natomiast specyficzna projekcja tj. kontralateralne neurony piramidalne, zostały oznaczone za pomocą znacznika tdTomato. Aktywność neuronów znakowanych GCaMP została zarejestrowana u myszy podczas swobodnego poruszania się na otwartej arenie podczas 20 minut. Następnie na głowie zwierzęcia zamocowano adapter Airyscan, a neurony projekcyjne znakowane tdTomato oraz neurony GCaMP obrazowano za pomocą mikroskopu konfokalnego poprzez soczewkę GRIN (Rysunek 4).

Rejestracja neuronów projekcyjnych

Po zapisaniu danych, mapy komórek z obu modułów są generowane przy użyciu interfejsu API oraz oprogramowania Inscopix Data Processing Software (IDPS). Dwukanałowe obrazy struktur z mikroskopu konfokalnego są następnie generowane w obrazy 2D poprzez dopasowanie do ogniskowej z miniskopu. Obrazy z zielonymi strukturami (GCaMP) wraz z orientacyjnymi punktami projekcji są wykorzystane do tworzenia tzw. macierzy transformacji, które następnie są stosowane do znakowania komórek. Umożliwia to rejestrację komórek w różnych modułach (Rysunek 4B-D). Dodatkowo, nasze oprogramowanie upraszcza proces wspólnej rejestracji, co pozwala naukowcom na szybkie uzyskiwanie wyników.



Rysunek 4. A. Obrazowanie neuronów mPFC znakowanych GCaMP6 u swobodnie poruszających się zwierząt za pomocą systemu nVista 3.0, który generuje obrazy struktur oraz funkcjonalną mapę komórek GCaMP z wyodrębnionym znakowaniem komórkowym. B. Obrazowanie neuronów mPFC znakowanych GCaMP6 oraz tdTomato za pomocą czujnika Airyscan montowanego na głowie zwierzęcia, który generuje obrazy struktur znakowanych na czerwono i zielono, a także funkcjonalną mapę komórek GCaMP z wyodrębnionym znakowaniem komórkowym. C. Obrazy struktur pochodzące z systemu nVista są obracane i odwracane (po lewej) w celu dopasowania orientacji do danych zapisywanych przez Airyscan. Maksymalna projekcja danych Airyscan GCaMP jest generowana w celu dopasowania ostrości nVista (po prawej). Punkty orientacyjne projekcji w obydwóch modułach są następnie wybierane do tworzenia macierzy transformacji. D. Macierz transformacji jest nakładana na strukturę nVista oraz na mapę komórkową. Następnie na przekształconą mapę komórek znakowanych GCaMP nVista, system nakłada statyczną mapę komórek tdTomato z Airyscan, co pozwala na wygenerowanie scalonej mapy komórek, w której żółte, nakładające się komórki są identyfikowane jako neurony kontralateralne.

Dyskusja

Analiza mechanizmów obwodów neuronalnych stanowi podstawę do zrozumienia złożonych procesów poznawczych oraz behawioralnych, co w rzeczywistości odgrywa kluczowe znaczenie do poznania skomplikowanych funkcji mózgu zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych. Platforma MIRA doskonale łączy proces rejestracji aktywności obwodów neuronowych wraz z wielokanałowym obrazowaniem o wysokiej rozdzielczości, dzięki czemu pozwala pogłębić naszą wiedzę na temat funkcjonowania obszarów mózgowych. MIRA otwiera zupełnie nowe możliwości badań dotyczących dynamiki obwodów neuronowych u swobodnie poruszających się zwierząt. Między innymi umożliwia identyfikację kilku podtypów neuronalnych oraz pozwala na obrazowanie komórek nie-neuronowych, a także markerów zmian patologicznych, rozszerzając w ten sposób zakres zastosowań w różnorodnych dziedzinach neuronauki.

Źródła

1. Ghosh, K. K. et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope. [Nat Meth 8, 871–878 \(2011\)](#).
2. Ziv, Y. et al. Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. [Nat. Neurosci. 16, 264–266 \(2013\)](#).
3. Stamatakis, A. M. et al. Simultaneous Optogenetics and Cellular Resolution Calcium Imaging During Active Behavior Using a Miniaturized Microscope. [Front. Neurosci. 12, 496 \(2018\)](#).

iNSCOPIX

ANIMA LAB
wyposażenie zwierzętarni i laboratoriów • modele zwierzęce

info@animalab.pl

www.animalab.pl