



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar

In vivo elektrofiziológia ötvözése kétfoton mikroszkópiával

Tasnády Kinga Réka

Egészségügyi mérnök MSc. II.

Külső konzulens:

Dr. Márton Gergely

MTA TTK

Belső konzulens:

Dr. Benyó Balázs

BME IIT

Dr. Szlávecz Ákos

BME IIT

2017

Kivonat

Kulcsszavak: agy-gép interfész, mikroelektród, elektrofiziológia, kétfoton mikroszkópia, PEDOT, GCaMP6f, in vivo

Dolgozatomban azon kísérleti elrendezés létrehozását mutatom be, melynek célja, hogy az agyi jelek mérésének két legmodernebb, legnagyobb felbontást biztosító módszerét ötvözze: szövetbe ültetett mikroméretű elektródokkal végezhető agykérgi elektrofiziológiát és a speciális, sejt szintű felbontást lehetővé tevő, háromdimenziós – kétfoton – mikroszkópiát. Ezen mikroszkóppal és a mikroelektronikai érzékelőkkel megvalósítható, hogy az agy egyes területein egyrészt elektromos jeleket tudjunk mérni, másrészt ezzel párhuzamosan optikailag is monitorozzuk azokat, így részletes képet kaphatunk a vizsgált agyterületek kapcsolatairól és funkcióiról. A módszerek ötvözésével rávilágíthatunk a különböző mérési metódusok jellemző tulajdonságaira, továbbá hibáira, melyeket figyelembe véve a jelenlegiekénél hatékonyabb agy-gép interfész rendszereket fejleszthetünk ki.

A tanulmányban GCaMP6f transzgénikus egereken végzett in vivo kísérleteim módszereit és eredményeit ismertetem. A génmódosított rágcsálók agyszövetébe olyan elektródokat ültettem, melyek felületére vezető polimer (PEDOT:PSS) került leválasztásra, ami nem csupán az eredeti Pt/Ir felületnél alacsonyabb impedanciát – és következésképpen jobb jel-zaj viszonyt eredményezett –, hanem ezen felül a polimer fluoreszcens tulajdonságainak köszönhetően az elektrofiziológiai mérőpontok pontos helye is vizsgálhatóvá vált.

Abstract

Keywords: brain-computer interface, microelectrode, electrophysiology, two-photon microscopy, PEDOT, GCaMP6f, in vivo

In my research report, I'm expounding the fusion of two of the most modern methods in neural activity measurement: an implanted microelectrode in order to monitor the neural electrophysiology and a special, three-dimensional – two-photon – microscopy, which is capable of high-resolution inspection on a cellular level.

Using this microscope and the microelectronic sensors, we are able to simultaneously measure the local electrical signals of a certain brain region, and optically monitor the same area, thus we can receive a detailed view of the connections and activities of the examined brain regions. With the combination of these methods, the key features – and errors – of the different measurement methods can be examined. Taking these into account, we will have a chance to develop brain-computer interface systems of superior efficiency.

The herein presented study includes methods and results of my in vivo measurements, performed on transgenic GCaMP6f mice. I implanted such electrodes into the brains of the rodents which had been surface-coated with a conductive polymer (PEDOT:PSS), which not only decreased the impedance of the original (Pt/Ir) surface – and thus increased signal-to-noise ratio –, but due to the fluorescent properties of the polymer, the exact locations of the electrophysiological measurement points became apparent.

Tartalomjegyzék

Kivonat	1
Abstract.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	6
I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	7
II. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
II. 1. 1. Neurofiziológiai módszerek.....	9
II. 1. 2. Idegszövetbe ültethető elektródok.....	10
II. 1. 2. 2. Extracelluláris elektródok.....	10
II. 1. 3. Vezető polimerek alkalmazása.....	11
II. 1. 3. 1. PEDOT:PSS	12
II. 1. 4. Multielektródok.....	13
II. 2. Kétfoton mikroszkópia.....	14
II. 2. 1. Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp működése.....	14
II. 2. 2. Élő állat vizsgálata.....	16
II. 3. GCaMP6f – az idegi aktivitás fluoreszcens indikátorai.....	16
II. 3. 1. GFP fehérjék ismertetése.....	16
II. 3. 2. Genetikailag kódolt kalcium indikátor működése.....	16
II. 3. 3. Kalmodulin, kalmodulin-kalcium komplex szerkezete.....	17
II. 3. 4. GCaMP6f / GP5.17.....	18

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	20
III. 1. Az elektród preparáció ismertetése.....	20
III. 2. GCaMP6f transzgenikus egerek ismertetése.....	20
III. 3. Műtési protokoll.....	21
III. 4. Mikroszkópia és elektrofiziológia.....	23
III. 4. 1. Kétfoton mikroszkópiás mérés.....	23
III. 4. 2. Matlab környezetben implementált algoritmus a kétfoton mikroszkópiás felvételek kiértékeléséhez.....	24
III. 4. 3. Elektrofiziológiai mérés ismertetése.....	26
IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	27
IV. 1. Elektródbevonat karakterizációja in vitro kétfoton környezetben.....	27
IV. 2. In vivo kétfoton mikroszkópia.....	28
IV. 2. 1. Matlab környezetben implementált algoritmus alkalmazása a neuronok intenzitásváltozásainak nyomkövetésére.....	29
IV. 3. Elektrofiziológiai mérés eredménye.....	31
IV. 4. Eredmények összesített kiértékelése.....	32
V. TOVÁBBI LEHETŐSÉGEK.....	33
VI. ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
VII. IRODALOMJEGYZÉK.....	36
VIII. ÁBRÁK JEGYZÉKE.....	41
IX. FÜGGELÉK.....	42

Függelék_1: Öröklődés vizsgálatának, valamint az egerek tenyésztésnek menete	42
Függelék_2: Tetoválódoboz tervezése Autodesk Inventor-ban.....	43
Függelék_3: Matlab környezetben írt kód – Sejtkereső algoritmus	44
X. MELLÉKLET	45
Melléklet_1: Polimeráz láncreakció	45

Rövidítések jegyzéke

Au – arany

bGH – szarvasmarha növekedési hormon

BMIMBF₄ elektrolit – 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate

Ca²⁺ – kalcium ion

Ca²⁺-CAM – kalmodulin-kalcium komplex

CAM – kalmodulin

ECoG – elektrokortikográfia

EDOT-monomer – 3,4-ethylenedioxythiophene

EEG – elektroencefalográfia

FRET – fluoreszcencia energia transzfer

GCaMP6f – transzgénikus állatok fluoreszcens fehérjéje (GFP + CAM + M13)

GENIE – Genetically-Encoded Neuronal Indicator and Effector

GFP – zöld fluoreszcens fehérje

Ir – irídium

M13 – miozin könnyűlánc-kináz fehérjéje

MEMS – mikro-elektromechanikai rendszerek

PCR – polimeráz láncreakció

PEDOT:PSS – poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate

PMT – fotoelektron-sokszorosító

Pt – platina

Pt/Ir elektród – platina/irídium elektród

SU-8 – negatív fotoreziszt polimer

Thy1-promóter – thymus sejt antigén promótere

UV-fény – ultraviola fény

VIS tartomány – fény látható tartománya

WPRE – hód hepatitis vírus poszttranszkripciós szabályozó régió

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Napjainkban egyre több kísérlet irányul az idegszövetbe ültethető elektródok felé, hiszen általuk könnyen mérhetővé válnak a neuronok közötti potenciálkülönbségek, így egyre kiterjedtebb, pontosabb képet kaphatunk az egyes agyterületek funkciójáról, valamint azok kapcsolatairól [1] [2], továbbá ezen érzékelőeszközök egyre nagyobb szerepet kapnak az orvostudományban is, mivel általuk különböző betegségek – disztónia [3], epilepszia [4], Parkinson-kór [5] – kezelhetővé válnak. Ám az érzékelők nem nyújtanak elegendő információt a neurális hálózatról, a sejtek közötti kapcsolatokról, így szükséges optikailag is detektálni az agyszövetben végbemenő folyamatokat.

Jelen dolgozatban bemutatott kutatás célja az extracelluláris elektródok és a kétfoton mikroszkóp [6] – mint megfelelő felbontású és érzékenységgű optikai eszköz – ötvözése, továbbá a párhuzamos mérési eljárás kidolgozása. A módszerek együttes alkalmazása által megvalósíthatóvá válik, hogy az agy egyes területein egyrészt elektromos jeleket tudjunk mérni, másrészt ezzel párhuzamosan optikailag is monitorozzuk azokat, így részletes képet kaphatunk a vizsgált agyterületekről. Ezen metódusok kombinálása által a közeljövőben a jelenlegieknél sokkal hatékonyabb agy-gép interfészek kialakítása válik lehetővé.

Ahhoz, hogy ezt a kísérleti elrendezést lehetővé tegyük, szükség volt GCaMP6f transzgénikus egerekre – genetikai állományuknak meghatározása az Akadimpex Kft. laborjában (Budapest, Magyarország) történt –, melyek agysejtjei a génmódosításnak köszönhetően fluoreszkálnak kétfoton környezetben [7]. A rágcsálók agyszövetébe került beültetésre az agyi jelek rögzítését lehetővé tevő Pt/Ir érzékelő, mely felületére PEDOT:PSS fluoreszcens vezető polimer [8] került leválasztásra *Dr. Marek Tamás és kutatócsoportja* által.

A mérési módszer kalibrációjához, illetve a működésének validációjához olyan kísérletek megtervezésére és végrehajtására volt szükség, melyek lehetővé tették a fluoreszcens polimerrel bevont elektród karakterisztikájának mind *in vitro*, mind *in vivo* kétfoton környezetben történő meghatározását.

A kísérlet további célja volt, hogy egyidejűleg megvalósítsam az *in vivo* kétfoton mikroszkópiás mérést és az elektrofiziológiai elvezetést az előzetesen koponyaablakkal és elektróddal ellátott kisállatokon.

Kísérletsorozat tervezett lépései:

- Egerek beszerzése külföldi laboratóriumból.
- Rágcsálók genetikai állományának meghatároztatása, jelölésük tetoválással.
- PEDOT:PSS fluoreszcens vezető polimer leválasztatása Pt/Ir elektródra.
- Elvezető karakterizálása kétfoton környezetben, in vitro.
- Műtéti protokoll kidolgozása.
- Műtét elvégzése.
- Kétfoton mikroszkópia, in vivo.
- Elektrofiziológiai vizsgálat elvégzése.
- Kiértékelő környezet megtervezése és implementációja.
- Vizsgálati eredmények elemzése és értékelése.

II. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

II. 1. 1. Neurofiziológiai módszerek

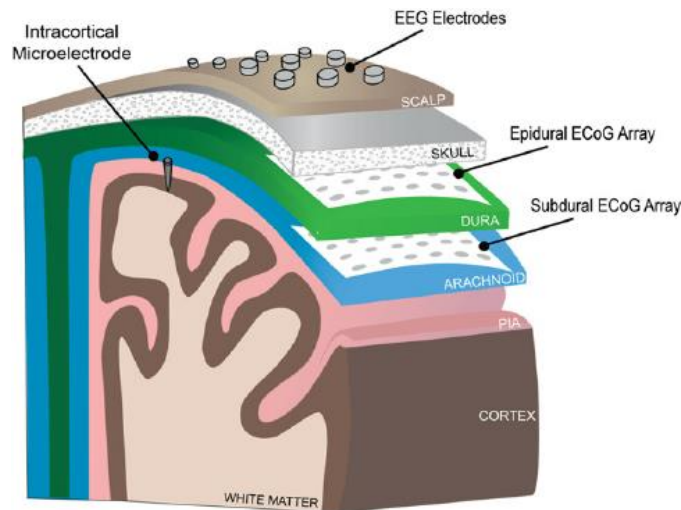
A neuronok kisméretű, információfeldolgozásra képes sejtjei az idegrendszernek. Sejttestükből sok elágazó, különböző hosszúságú dendrit és axon nyúlik ki. Ezen neuronok dendrit nyúlványaikon felveszik az információt, majd azt elektromos jelekké alakítják.

Két jelet tudunk megkülönböztetni; az első a helyi mezőpotenciálváltozás, míg a második – a nem minden esetben megjelenő – akciós potenciál, mely tovaterjedésével a következő neuront aktiválja, mivel az axon terminális részén különböző transzmitterek felszabadulását okozza. Az ingerületvezetés mindig egy irányú, az egymással szemben érkező akciós potenciálok kioltják egymást [9].

Ezen idegi aktivitásokat rögzíteni és tanulmányozni tudjuk azáltal, hogy a helyi elektrotónusos potenciálváltozások ioncsatornákat nyitnak és zárnak, melyeken keresztül folyó ionáramokat elektródok segítségével mérni lehet. A különböző elektródokkal mind az idegszöveten belüli [10], mind azok felszínén létrejövő potenciálváltozások mérhetőek (*1. ábra*).

Az elektrokortikográfia – agyfelszínre rögzített elektródok – legnagyobb hátránya az invazitása, így csak ritkán – orvosilag különösen indokolt esetben – alkalmazható annak ellenére, hogy jó a jel-zaj aránya [11] [12].

A *cortex cerebi*-ben lejátszódó elektromos változások akár a hajás fejbőrön át is észlelhetőek az elektroencefalográfiának köszönhetően. Ezen mérési módszer egy igen kedvelt non-invazív módszer. Legfőbb hátránya a rossz térbeli felbontása, mely miatt nem vizsgálhatóak az egysejt aktivitások, csak nagyszámú idegsejt szinkronizált, összegzett aktivitása. További hátránya a koponya szigetelő hatása miatt keletkező rossz jel-zaj arány [13] [14].



1. ábra: EEG, epidurális és szubepidurális ECoG, valamint az intrakortikális mikroelektrod elhelyezkedése a különböző anatómiai egységekben [K1].

II. 1. 2. Idegszövetbe ültethető elektródok

Az idegsejt aktivitás mérési módszereit két csoportba sorolhatjuk azok metódusa alapján; intra- és extracelluláris mérésekre.

Főbb különbségek, hogy míg intracelluláris mérés esetében a sejten belüli térből mérhetünk, addig az extracelluláris elektródok alkalmazásával a sejten kívüli térről tudunk információt gyűjteni, továbbá, hogy intracelluláris eszköz használata esetén egy – esetleg néhány – neuron aktivitását, pontosabban szinaptikus, akciós és membránpotenciálok értékeit rögzíthetjük, míg extracelluláris mérési környezetben egy vagy akár populációs neuronok aktivitását figyelhetjük meg, azok mezőpotenciáljai, tehát szummált szinaptikus aktivitásaik által [15].

II. 1. 2. 2. Extracelluláris elektródok

Az extracelluláris mátrixból elvezető mérőeszközök mérete és impedanciája alapján elkülöníthetünk mezőpotenciálok elvezetésére alkalmas szenzorokat és neurális elvezetéseket. Mezőpotenciálok elvezetésére nagyobb geometriai felületű intracerebrális makroelektrodok használatosak, míg mikroelektrodokkal mind a mezőpotenciálok, mind az úgy nevezett egysejt aktivitások elvezetése kivitelezhető [16].

Az érzékelő-felület impedanciája az egyik legkritikusabb tényezője az elektródokkal való méréseknek, hiszen befolyásolja többek közt a jel-zaj arányt, mivel az elektródok effektív felületének csökkenésének hatására az impedancia növekedni fog. Emiatt célszerű nagy

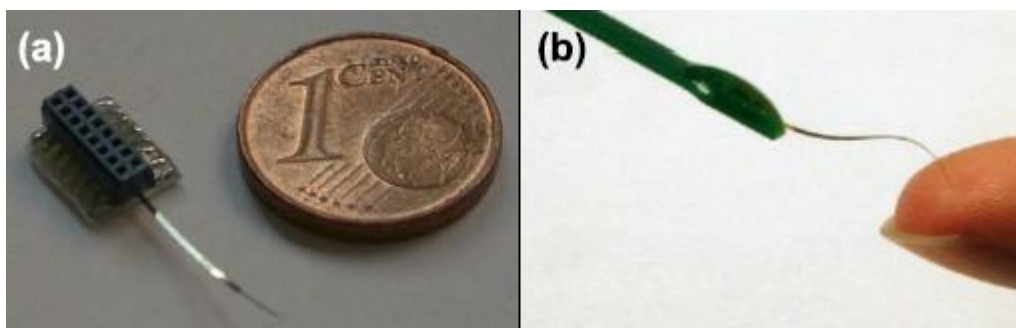
fajlagos felületű anyagokból – például szén nanocsövek, vezető polimerek, szivacsos struktúrájú fém bevonatok – kialakítani az elektródokat [17].

Az extracellulárisan idegszövetbe ültethető mikroelektródok 3 fő típusba sorolhatók; lehetnek fémből készíttetek, szilícium elektródok vagy polimer alapú flexibilis implantátumok.

A fémelektródok többnyire rozsdamentes acélból vagy wolframból készülnek. Ezen elektródok a regisztrált idegsejt pozíciójának meghatározására alkalmazhatók.

A szilícium elektródok közül a legelterjedtebbek a Michigan és az Utah típusúak. Ezek jellemzője a nagy szenzorsűrűség, valamint az ebből eredő nagy térbeli felbontás. Hátrányuk, hogy igen merevek, így heves immunreakciókat váltanak ki agyszövetbe ültetve, hiszen nem képesek annak pulzálását lekövetni [18] [19].

A szilícium elektródokkal ellentétben a flexibilis polimer alapú elektródok (2. ábra) mechanikai tulajdonságai kedvezőbbek a lágy agyszövetre nézve, hiszen képesek annak apró mozgásaihoz, pulzálásához idomulni, így sokkal kisebb mértékű immunválaszt váltanak ki, ami miatt jelentősen csökken a gliális hegszövetek területe is [20] [21] [22]. Leggyakrabban neurális mikroelektródok szigetelőanyagaként alkalmazott biokompatibilis polimerek közé a parilén-C, a poliimid és a SU-8 tartozik.



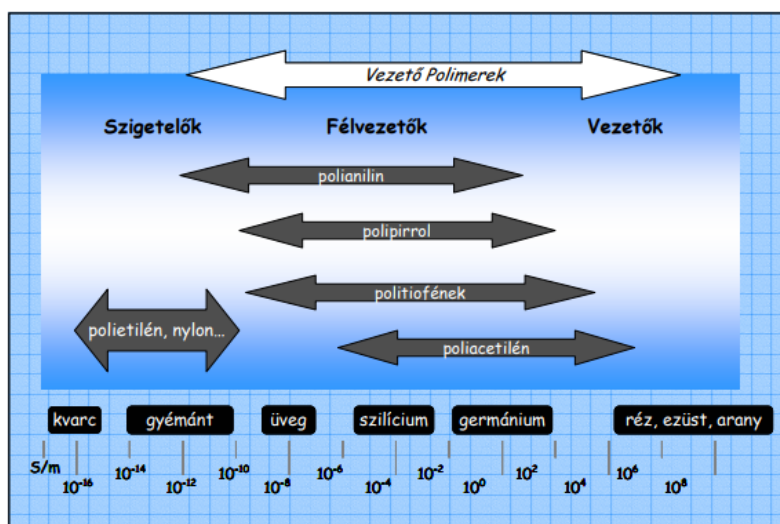
2. ábra: Agyszövetbe implantálható flexibilis multielektródok [a: K2a, b: K2b].

II. 1. 3. Vezető polimerek alkalmazása

Ezen polimereket az utóbbi időben gyakran használják bioelektródok alapanyagaként, hiszen szintetizálásuk egyszerű és viszonylag olcsó. További előnyük, hogy növelik az orvosbiológiai eszközök stabilitását – mely tulajdonságuk legfőképp krónikus implantátumok esetén kiemelkedő jelentőségű – , sebességét és érzékenységét is, valamint, hogy könnyen modulálhatóak – fizikai tulajdonságaiknak köszönhetően.

A vezető polimereket gyakran alkalmazzák sejtszekvenáláshoz is, molekulacsapda készítésére, továbbá adalékanyagként is [23].

Az elektródfelületre leggyakrabban leválasztott vezető kémiai anyagok a polipirrol/peptid [24], a politiofén [25], valamint a PEDOT [26] [27], melyek jelentősen képesek javítani a sejt-elektrod kapcsolatban a krónikus mérések során. Az 3. ábra a polimerek vezető tulajdonságait szemlélteti más, gyakori vezető anyagokkal összehasonlítva.



3. ábra: Vezető polimerek fajlagos vezetési értékei más, közismert anyagokkal összevetve [K3].

A vezető polimerek alkalmazása csökkenti a szervezet immunválaszát az elektród körüli szövetekben [20], valamint csökkentik az elektródok impedanciáját és a termikus zajt is.

Ezen polimereket leggyakrabban szilícium alapú elektródokra választják le, melyek felületét így megnövelik, mellyel együtt növekszik az elektródok tárolt töltés befogadóképessége is [28], ezzel kialakítva a jobb elektromos és ionos vezetést.

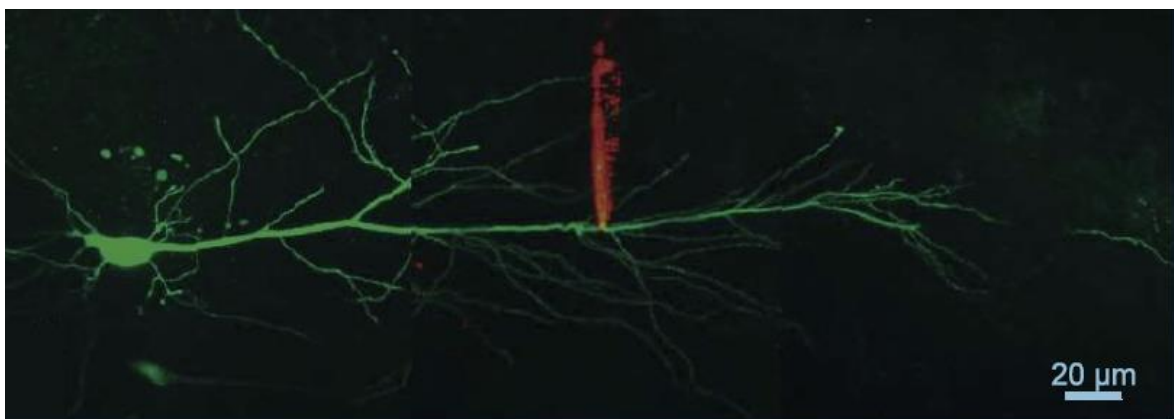
Az elektródimpedanciák csökkentésére – melyek az agyszövetbe ültethető implantátumok méretéből adódnak – az egyik kedvező módszer a vezető polimerből készített nanocsövek elektrokémiai leválasztása, például PEDOT esetén [29].

II. 1. 3. 1. PEDOT:PSS

Mivel a vezető polimerek alkalmazhatóak az elektródok hordozójaként is, így létrehozható egy flexibilis, hosszútávon is biokompatibilis orvosbiológiai eszköz [30]. Ezen polimer elektródok leggyakrabban Au, Ir és Pt leválasztott réteget tartalmaznak, ezzel biztosítva az

elektromos jelvezetést. Mivel a PEDOT:PSS megfelelő biokompatibilitással és kémiai stabilitással, valamint kiváló vezetési képességgel rendelkezik, így használata igen célszerű. A megfelelő felhasználhatóság érdekében a PEDOT réteg vákuum fázisból kerül polimerizálásra [31], így kialakítható belőle az önálló filmréteg az elektródon.

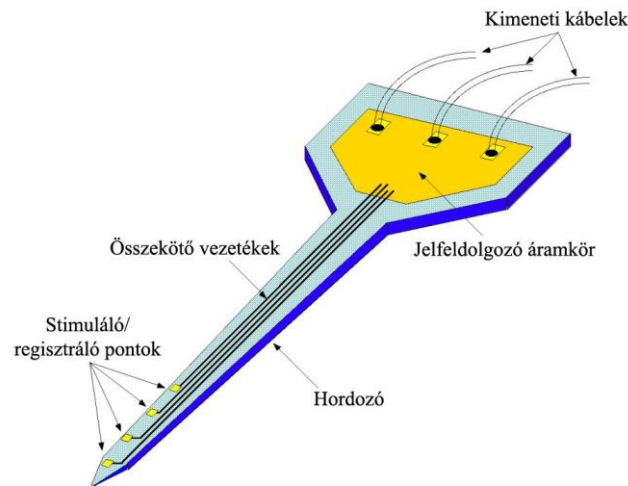
Ahhoz, hogy kétfoton mikroszkóp által láthatóvá tessük az elektródot, fluoreszcens molekulákat kell leválasztanunk rájuk, így annak pontos helye meghatározhatóvá válik az agyszöveten belül. A fluoreszcens kvantumpöttyök felhasználása a legkézenfekvőbb megoldása az elektród láthatóvá tételének (4. ábra), melyek a PEDOT molekulák felületére kerülnek leválasztásra [32] [8].



4. ábra: PEDOT kvantumpöttyökkel bevont patch-clamp pipetta, valamint fluoreszcens anyagot tartalmazó idegsejt kétfoton mikroszkóppal készült képe [K4].

II. 1. 4. Multielektródok

Mivel a lokális idegsejt csoportosulásokról történő elvezetésre egyetlen elektród is alkalmas, ám az általa kinyerhető információ igen kevés, szükségessé vált a multielektródok (5. ábra) létrehozása a mérő kontaktusok számának növelésével, melyek által már elkülöníthetővé válnak a sejtcsoportosulások különböző egységei [33]. A multielektródok között jelentős gyártás-tulajdonságbeli különbségek lehetnek. Ilyen többek közt az elektródok száma és anyaga, a huzal-együttes elrendezése, valamint a huzalok szigetelésére és védelmére használt anyagok.



5. ábra: Központi idegrendszerben alkalmazható multielektród [K5].

II. 2. Kétfoton mikroszkópia

Az anatómia hagyományos módszereivel kitűnően vizsgálhatók a fixált szövetekben az idegsejtek részletei, a dendrittüskék, az axonok, továbbá a szinapszisok is. Az élettani vizsgálatok által feltérképezhetők a sejtek membránjaiban elhelyezkedő ioncsatornák, valamint megismerhetők ezek működése és a sejtek ingerelhetősége. A kétfoton pásztázó lézermikroszkópia – kétfoton mikroszkópia – létrehozásával egyszerre vizsgálható a funkció, a működés és az anatómiai szerkezet is [34] [35] [36].

A kétfoton mikroszkóppal való mérés legfontosabb újszerűsége, hogy jelentősen kisebb a szövetkárosító hatása a korábban használt lézersugaras módszerekhez képest, hiszen ebben az esetben a gerjesztő lézersugár energiája csak a körülbelül $0,3 \mu\text{m}$ átmérőjű, $0,1$ femtoliter térfogatú fókuszpontban éri el a vizsgálni kívánt anyag kétfotonos gerjesztéséhez szükséges fényintenzitást. Ennek hatására a sejtekbe juttatott fluoreszcens indikátor gerjesztődik, ám a fókuszponton kívül eső szövetekben nem okoz sejtpusztulást a lézer [34].

A kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópia egy újfajta fluoreszcencia mikroszkópia, amely nemlineáris optikai elven működik.

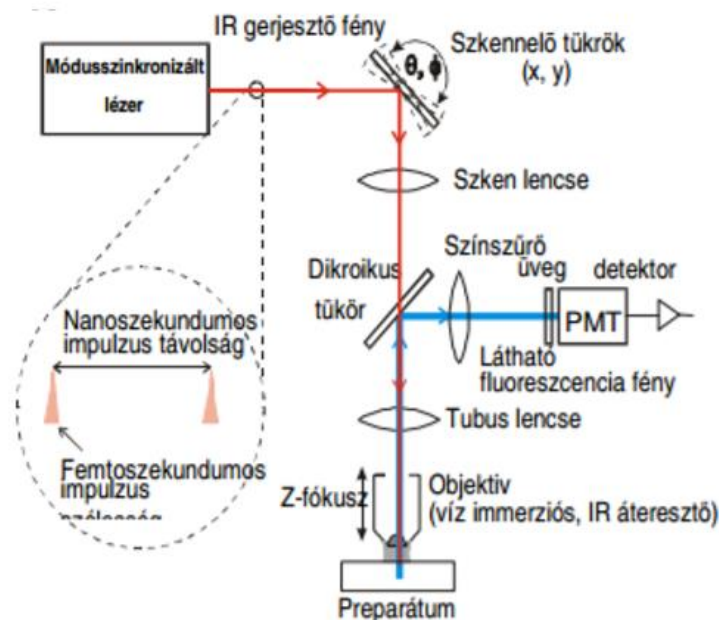
II. 2. 1. Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp működése

A kétfoton-effektus során egyszerre két foton abszorbeálódik a gerjesztendő molekulában, ezáltal az energiájuk összeadódik. Ilyen másodrendű folyamat csak nagy fényintenzitások esetén keletkezik, mely létrehozásához módusszinkronizált lézer szükséges – mely a lézer

energiáját időben impulzusokba sűríti (80 Mhz-el) –, így az átlagos lézereenergia alacsony értéken (5-20 mW) tartható, ezáltal elérhető a gerjesztéshez szükséges nagy fényintenzitás a fókuszpontban az igen rövid (~ 100 fs-os) impulzusok ideje alatt [37].

A mikroszkópban a fókuszált infravörös lézerimpulzus gyújtópontjában akkora fényintenzitás állítható elő, mely hatására a látható tartományban (VIS) elnyelő fluoreszcens festékek gerjeszthetők. A folyamat lényege, hogy a mintában lévő fluoreszcens festék infravörös fényt nyel el, majd körülbelül kétszeres frekvenciájú látható fényt bocsát ki [34] [37].

Hullámhossz-szelektív dikroikus tükrökkel és színszűrőkkel kiszűrhető a gerjesztő infravörös fény. A VIS-tartományba eső fluoreszcens fény fotoelektron-sokszorozókkal (PMT, 6. ábra) detektálható. Amennyiben olyan fluoreszcens festéket alkalmaznak a mérés során, amelynek abszorpciós hatáskeresztmetszete, fluoreszcencia élettartama, emissiója bármely sejtben jelenlévő ion vagy fiziológiai hatásra megváltozik – például Ca^{2+} , membránfeszültség módosulása –, akkor a fiziológiai folyamatok valós időben lekövethetők. A kétfoton effektus következtében a fluoreszcens festék csak a fókuszfoltban és annak kis forgási ellipszoid alakú környezetében gerjesztődik, így a mikroszkóp kiemelkedő háromdimenziós térbeli felbontásra képes. A kép pásztázó eljárással készül, tehát a gerjesztőfolt tükrökkel való gyors mozgatásával letapogatható az adott fókusz sík, melynek a rekonstruálását számítógépes szoftver végzi [34] [37] [6].



6. ábra: A kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp működési elvének bemutatása

[K6].

II. 2. 2. Élő állat vizsgálata

Kétfoton mikroszkóppal *in vivo*, előaltatott állatban is lehetséges az idegsejtek tanulmányozása az agykéregben, akár 400 μm mélyen is [38] [39]. Fontos kiemelni, hogy ezzel a módszerrel viszonylag kicsiny károsító hatással és nagy feloldással jellemezhető az intakt agyműködés vizsgálata. A fluoreszkáló anyagok segítségével megjelenített sejtválaszokat – az eddig módszerekhez képest – kimagasló idő- és térbeni felbontásban figyelhetik meg az akut vagy túlélő agyszeletekben – a csekély fotokárosodás és az infravörös gerjesztés jobb szöveti penetrációja miatt [34].

II. 3. GCaMP6f – az idegi aktivitás fluoreszcens indikátorai

II. 3. 1. GFP fehérjék ismertetése

A zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein, GFP) egy Csendes-óceáni medúzafajból (*Aequoria victoria*) nyerték ki. A fehérje UV-fénnyel megvilágítva, azt elnyelve, zöld színű fényt bocsájt ki, mivel az elnyelődés miatt a molekulák magasabb energiájú állapotba kerülnek, majd relaxálódnak, és visszaállnak nyugalmi helyzetükbe, miközben leadják a felvett energia egy részét (disszipálódnak) [40].

II. 3. 2. Genetikailag kódolt kalcium indikátor működése

Több sejt egyidejű vizsgálatára különféle Ca^{2+} vagy feszültség indikátor fluoreszcens festékek alkalmasak. A festékek használhatósága igen korlátozott, mivel minden sejt-típusban kifejeződnek, így nem biztos, hogy a kívánt idegsejt aktivitása vizsgálható velük. A probléma megoldása a genetikailag kódolt fluoreszcens aktivitás marker gének transzgénikus állatokban való sejt-specifikus kifejezése, továbbá ugyanezek a gének nyomjelző vírusokkal az idegrendszerbe való bevitele.

A genetikailag kódolt fluoreszcens aktivitás markereket neuron-specifikusan ki lehet fejezni szabályozó elemek segítségével, valamint vírus alapú génbevitellel. A Ca^{2+} -szenzorok – léteznek feszültség- és pH-senzorok is – alapjául a fluoreszcencia energia transzfer (FRET) jelenség szolgál.

A rendszer részét képezi a kiméra (fúziós) fehérje, mely komponensei a sárga és kék fluoreszcens fehérje, valamint a kalcium-kötő peptid.

Amennyiben magas a Ca^{2+} szint – aktív a sejt –, akkor a két fluoreszcens fehérje közel kerül egymáshoz, így a kék színű fehérje a gerjesztésekor átadja energiája egy részét a sárgának, ami ezért világítani fog. Ezek alapján elmondható, hogy a kék/sárga emisszió aránya a sejt aktivitásának fontos indikátora, hiszen ez az arány mutatja meg a sejtben lévő Ca^{2+} szintjét. FRET-en alapulnak a feszültségfüggő fluoreszcens szenzorok is. Ezen rendszerekben egy feszültségfüggő káliumcsatornához genetikailag kapcsolnak sárga és kék fluoreszcens fehérjéket. Ha csökken a feszültség, akkor a fluoreszcens fehérjék közel kerülnek egymáshoz az ioncsatorna térszerkezet változása miatt, így létrehozzák a FRET-et.

Transzgenikus állatokban, valamint herpesz vírus-alapú rendszerekben mindkét típusú aktivitás markert alkalmaznak [41] [42] [43].

II. 3. 3. Kalmodulin, kalmodulin-kalcium komplex szerkezete

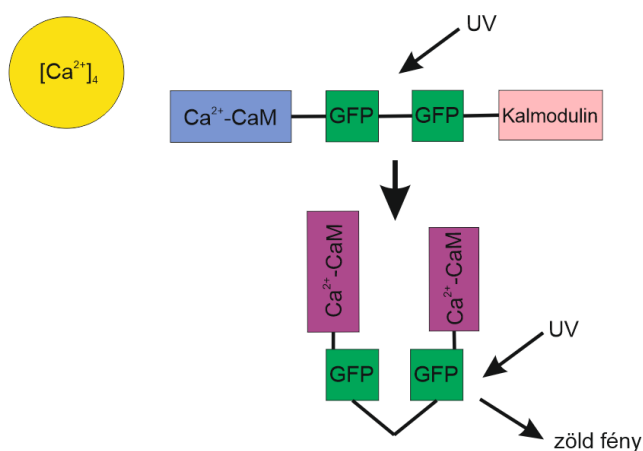
A kalmodulin (CaM), kalciumkötő fehérje minden eukarióta sejtben jelen van, azok sejt osztódásában, növekedésében, kiválasztásában, valamint az izom összehúzódások szabályozásában van szerepe, hiszen több mint harmincféle enzim működését befolyásolja. Aktiváló fehérjeként működik, tehát hormonális hatásra – Ca^{2+} sejtbe áramlásakor – enzimekhez kötődik. Ezen célenzimek szerkezete, funkciója, valamint a kalmodulinkötő régiói nagyon különböznek egymástól.

A kalmodulin a kalcium által szabályozott folyamatokban azok receptoraként működik. A kapcsolódásukkor kalmodulin-kalcium komplex jön létre – alap állapotában a kalmodulin rendezetlen gomolyag szerkezetű –, mely:

- 4 Ca^{2+} -iont köt meg,
- több enzim által katalizált folyamatban is közvetítő szerepet játszik,
- valamint aktiválja az alapvető sejt folyamatokban résztvevő enzimeket is, beleértve az ingerületközvetítő anyagok kibocsátását is.

A kalmodulin által megkötött 4 Ca^{2+} -ion kimerevíti a fehérje két terminális régióját a kialakuló oktaéderes szerkezet segítségével, így létrejön egy nagy energiájú állapot; egy rendezetlen régióval összekapcsolt domén pár, melyek felülete hidrofób, körülöttük pedig pozitív töltésű aminosavak helyezkednek el. A kalmodulin kisebb energiájú állapotba való lépéséhez szükséges a szerkezetet összekötő régióinak a meghajlása, mely akkor lehetséges, ha a közelben lévő enzimek bázikus, hidrofób aminosavakat tartalmazó szakaszához a

komplex a saját doménjeivel kapcsolódik (7. ábra). A kapcsolódáskor – és így az aktívhely elfedésekor – aktiválja a célnizmet [44].

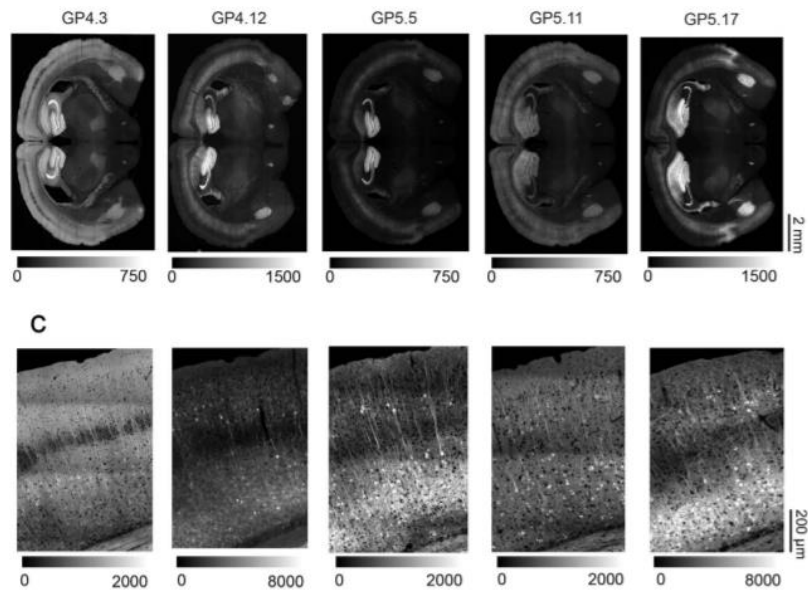


7. ábra: Kalmodulin-kalcium komplex kialakulásának sematikus ábrája.

II. 3. 4. GCaMP6f / GP5.17

A GCaMP6f – mely rendkívül gyors válaszadási kinetikával rendelkezik – indikátora és ultraszenzitív detektora a neurális egysejt aktivitásnak. Átala vizsgálhatóvá és monitorozhatóvá válik az egerek motoros, szomatoszenzoros, valamint vizuális cortexében, továbbá a hippocampusban – a stabil expressziós szintnek köszönhetően – a neuronok közt lejátszóó szinapszisok folyamata [45].

Dana et al. 2014-es *Thy1-GCaMP6f*-ről szóló cikke alapján az egerekben expresszáldott különböző fehérjék közül a GP5.17-et választottuk, mivel ennek a fehérjének a legnagyobb a fényerőssége a többi egerekben már monitorozott változatokhoz képest. Ezt a fényerősséget szemlélteti a 8. ábra, melyen a GP5.17-es változat van összehasonlítva négy másik, egerekben expresszáltatott változattal. Látható, hogy a GP5.17-es változatnál különíthetőek el leginkább az egér agyának expressziós mintát adó részei (8/a ábra), valamint, hogy ennél a változatnál lehet legszebben, legrészletgazdagabban látni az expressziós mintázatot (8/b ábra) [7].



18/a-b ábra: Különböző fehérjék expressziós mintázata egerek agyában [K8].

Fontos kiemelni továbbá, hogy a GP5.17-es változat néhány agyi régióban mért expressziós szintje összehasonlítható az adeno-asszociált vírus vektorral való fertőzés által okozott expresszióval – mely általában jelentősen magasabb szintű, mint a transzgénikus élőlényekben mérhető expressziós szint [46] –, valamint, hogy ezen változat produkálta a leggyorsabb válaszidőt is [7].

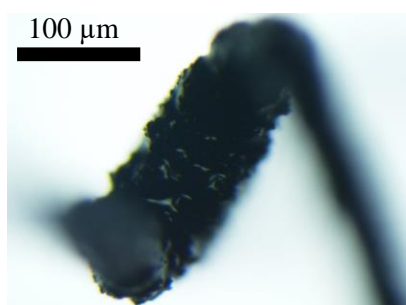
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III. 1. Az elektród preparáció ismertetése

A génmódosított rágcásalók agyszövetébe 40,46 μm vastagságú, 80%-ban platinát, a maradék 20%-ban pedig irídiumot [47] tartalmazó mikroelektródokat ültettem.

Ezen eszközök felületére vezető polimer (PEDOT) került leválasztásra. A bevonatot *Dr. Marek Tamás* készítette az MTA TTK Anyag- és Környezetkémiai Intézet Funkcionális Határfelületek Kutatócsoport laborjában (9. ábra).

A PEDOT réteg elektrokémiai polimerizáció által, EDOT-monomer és BMIMBF₄ elektrolit folyadék 0,1 M-os koncentrációjú oldatából lett ráválasztva az elektródra. A folyamatban Ag-elektrodot alkalmaztak referencia elektródként, Pt-lapot pedig segédelektrodként. Az elektrokémiai polimerizációt Autolab Potenziostat-tal végezték. A leválasztási folyamat egy ciklusa alatt a Pt/Ir elektród 1,5 V-ra volt kötve 2 másodpercig, majd 0 V-ra 28 másodpercig. Ezt a ciklust húsz alkalommal ismételték meg minden érzékelőn, majd MilliQ folyadékkal öblítették le azokat. A polimerizáció standard körülmények közt zajlott.



9. ábra: A Pt/Ir érzékelőre választott PEDOT:PSS sztereomikroszkópos képe.

III. 2. GCaMP6f tanszgenikus egerek ismertetése

A kísérleteket az MTA Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetében végeztem. Az állatokkal való bánásmód és a kísérletek megfeleltek az MTA Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetének szabályzatával és az 1998. évi XXVIII. számú állatvédelmi törvény állatkísérletekre vonatkozó (243/1998) szakaszának előírásaival, mely törvény megfelel az Európai Tanács 86/609/EGK irányelveinek.

Az *II. 3. 4. fejezetben* ismertetett tanulmányok alapján választott génmódosított egér tenyészpárokat a Jackson Laboratory-tól rendeltük (Bar Harbor, Maine, Egyesült Államok),

melyeket a Genetically-Encoded Neuronal Indicator and Effector (GENIE) Projekt keretében tenyésztettek a HHMI Janelia Farm Research Campus-on.

A transzgénikus egerek *Thy1*-promótert, GCaMP6f-et, hód hepatitis vírus posztranszkripció szabályozó régiót (WPPE), valamint szarvasmarha növekedési hormon (bGH) poliadenilációs szekvenciát tartalmaznak [45] [7].

A rágsálók neuronjainak aktivitása 940 nm-en, 50-100 mW lézerezéssel detektálható [45] négy-hat hónapos koruktól [48] [49].

A tenyészpárok megérkezése után elkezdődött az állatok szaporítása, mely menetének a leírása a *Függelék_1*-ben található. Mivel nem minden újszülött állat hordozza a kívánt génmódosulást [50], szükséges volt a genetikai állományukat polimeráz láncreakcióval (PCR) történő vizsgálata (ld. *Melléklet_1*). Az ismert genetikai állományú egereket tetoválással különböztettem meg egymástól, mivel ez a jelölési módszer bizonyult a legemberségesebbnek, legkíméletesebbnek – ellenben a gyakran alkalmazott csonkítási módszerrel –, valamint ennek a módszernek a krónikussága is megfelelőnek bizonyult – ellenben például a szőrfestési technikával.

A tetováláshoz, valamint a PCR-hez való mintavételezéshez szükséges volt rögzíteni a ketamin-xylazinnal bódított egereket. A rágsálók stabilantartásához Autodesk Inventor-ban terveztem egy befogó dobozt (ld. *Függelék_2*), melyet Formlabs (Somerville, Massachusetts, Egyesült Államok) Form2 3D nyomtatóval [51] nyomtattam ki (*10. ábra*).



10. ábra: 3D nyomtatott egérbefogó doboz.

III. 3. Műtéti protokoll

1. A génmódosított egerek kábítása izofluránnal történt, majd a szer hatása után kapták meg az altató injekciót. Altatóként ketamin-xylazin mixet használtam, melyben a ketamin 37,5 mg/ml, míg a xylazin 5 mg/ml koncentrációjú – természetesen az elegy a könnyebb

adagolhatóság érdekében tartalmaz Ringer-oldatot is. Az állatoknak 0,1 ml-t adtam intraperitoneálisan a szerkeverékből 100 testsúly grammonként. A későbbiekben szükség esetén kis mennyiségeket (~ 0,05 ml) adagoltam az alap dózishoz. A rágcsálók számára a vegyület-mixnek köszönhetően a műtéti beavatkozás szinte fájdalommentessé tehető.

2. Az altatás után következett az egerek tetoválása.

3. A megjelölést követően a kisállatokat rögzítettem a melegíthető műtőpadon – a hypothermia elkerülése végett – a fogak és a fülek befogásával. Az egerek szemét a kiszáradástól paraffin olajjal védtem meg, melyből 1-1 cseppet cseppentettem mindkét szemükre.

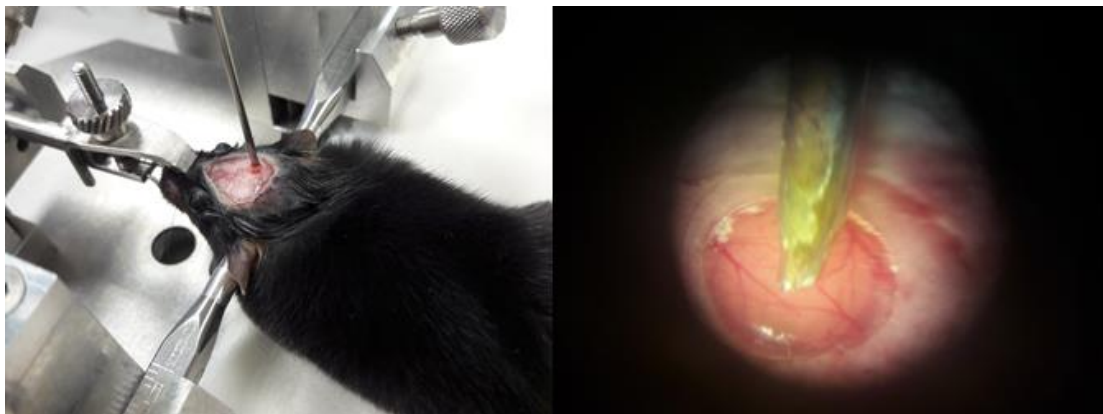
4. A műtéti előkészületek után a befogott kisemlős fejét fertőtlenítettem etil-alkohollal, majd eltávolítottam a szőrös fejbőrt.

5. A következő lépésben megtisztítottam a koponyát hidrogén-peroxid tablettával, valamint eltávolítottam a csonthártyát is egy kisebb szike segítségével.

6. Az egér koponyáján a motoros cortex fölött 3 mm átmérőjű lyukat fúrtam, mely a mediális varrattól 2 mm-re jobbra, a bregmától 3 mm-re posterior irányba került.

7. A fogászati fúróval készített lyukba került a PEDOT:PSS-sel bevont elektród, valamint annak a kivezetése, továbbá a Deckglaser (Németország) által gyártott kerek, 3 mm-es üveg (11. ábra). Az ablakot és az érzékelőt is fogászati akrillal rögzítettem a koponyához [52]. A csont felszínét is ezzel az anyaggal vontam be a fertőzések megelőzése érdekében, valamint ebből az anyagból alakítottam ki a koponyaablak körüli koronát (12. ábra), melybe tölthető pár csepp desztillált víz, ami nélkülözhetetlen a kétfoton mikroszkóp vízimmerziós lencséjének működéséhez.

A műtéti protokollt Dana et al. 2014-es, valamint Ye et al. 2017-es cikke alapján alakítottam ki [7] [48].



11. ábra: Koponyaablak beműtése.

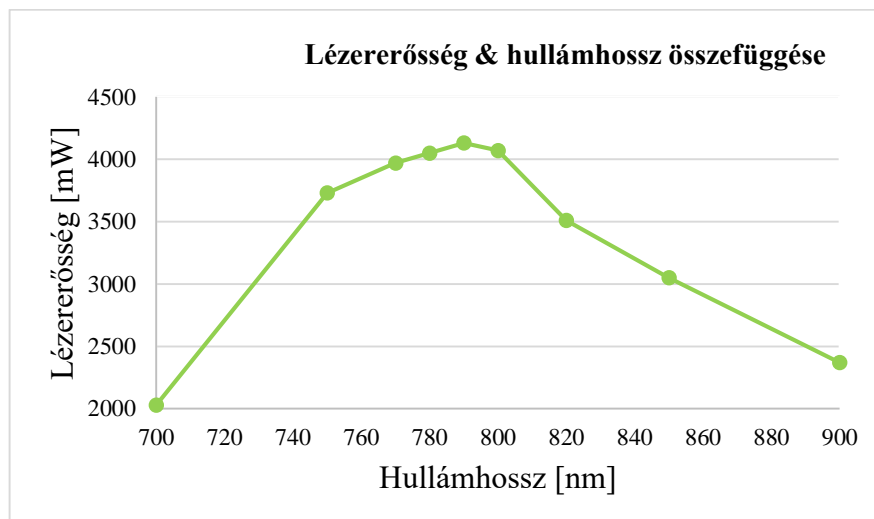


12. ábra: Transzgenikus egér koponyájára épített korona koponyaablakkal és PEDOT:PSS elektróddal.

III. 4. Mikroszkópia és elektrofiziológia

III. 4. 1. Kétfoton mikroszkópiás mérés

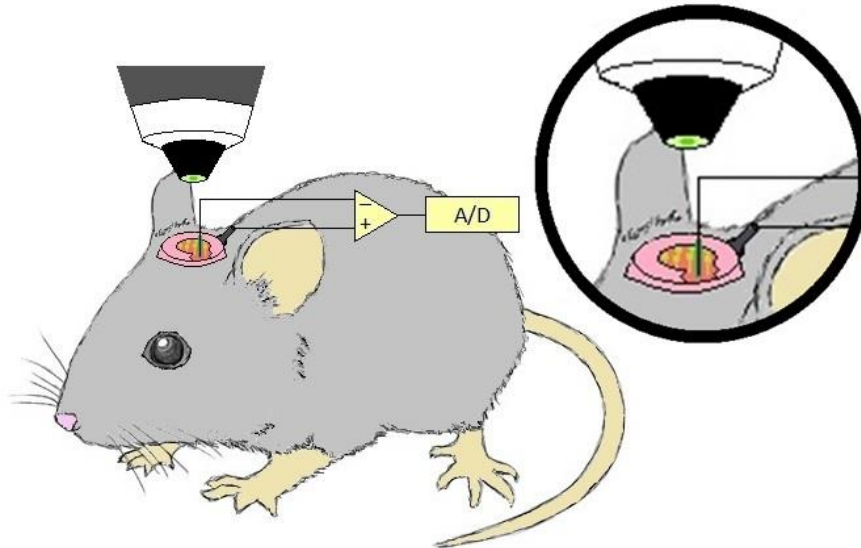
A kétfoton mikroszkópiás vizsgálatokat Femto2D-Resonant mikroszkóppal végeztem [53], melyet két szoftverrel lehet vezérelni; a MES, valamint a MESCS programmal. A mérésekhez az utóbbit használtam. A mikroszkópia során keletkező lézererősségnek és a beállított hullámhossznak a kapcsolatát a 13. ábra szemlélteti.



13. ábra: Kétfoton mikroszkópos mérés közben létrejövő lézererősség a beállított hullámhossz függvényében.

A PEDOT:PSS-t először pipettába töltve vizsgáltam a mikroszkóp alatt in vitro mérésként 700 és 900 nm között, majd elektródra választva ugyanezen hullámhossz tartományban.

Az in vitro vizsgálatokat in vivo vizsgálatok követték. GCaMP6f-et agyszövetében expresszáló egérbe ültettem a PEDOT:PSS-sel bevont elektródot, majd 760 és 940 nm-en [45] vizsgáltam az érzékelőt, valamint az állat neuronjait (14. ábra).



14. ábra: Sematikus ábrája az in vivo kétfoton mikroszkópiának, valamint az elektrofiziológiai mérésnek.

III. 4. 2. Matlab környezetben implementált algoritmus a kétfoton mikroszkópiás felvételek kiértékeléséhez

Ahhoz, hogy ki tudjam értékelni az in vivo kétfoton mikroszkópiás méréseim közben megfigyelt neuronok intenzitásváltozását, valamint, hogy a változásokat nyomon tudjam követni, készítenem és implementálnom kellett egy több lépésből álló módszert Matlab környezetben.

Algoritmus lépései:

1. Előfeldolgozás

- Kétfoton mikroszkópiás képek beolvasása.
- Képek zajszűrése azok átlagolásával, szegmentálás a háttér eltávolításával.
- Előfeldolgozott kép elmentése.

2. Sejtközpontok meghatározása

- Előfeldolgozott kép beolvasása.

- Sejtközpontok megkeresése a beállított tulajdonságok alapján.
- A sejtközpontok koordinátáinak elmentése.

3. Sejtközpontok körüli agyi aktivitás mérése

- Eredeti kétfoton mikroszkóp képek (videó) és sejtközpont koordináták beolvasása.
- Sejtközpontok körüli idegi aktivitás meghatározása.
- Az aktivitás kvantitatív meghatározása és a mérési eredmények mentése.

A kétfoton mikroszkóp *.MESc* formátumban menti el a felvett képsorozatot. A Matlab környezetbe történő beolvasásához rendelkezésemre állt egy *MEScreader* nevű program (melynek a tovább írt verziója – *MEScreader_1* – található a *Függelék_3. 1. fejezetében*). Ez a program a videóban szereplő képkockák pixelenkénti átlagolásával szűri meg a viszonylag zajos felvételeket. A program felhasználásával kaptam egy új képet, melyen szegmentálással a háttérrel el tudtam tüntetni, hogy egyértelműen láthatóvá váljanak a neonzöld idegsejtek. A *MEScreader* program által szűrt képet 16 bites *.jpeg* formátumban mentettem el, így információvesztés nem lépett fel, mivel az eredeti képek is 16-bites formátumban álltak a rendelkezésemre, viszont a kiértékelést jelentősen segíti a konvekció.

A feldolgozás következő lépésének megvalósításához az *intenzitas_algoritmus* nevű programot írtam meg. Ebbe a programba beolvastam a *.jpeg* formátumba kimentett átlagolt képet, melyen a sejteket kerestem. A kereséshez a sejtek környezetét maszkoltam – (zöld)színerősség, összefüggő pixelcsoport mérekszűrése. A vizsgálat szempontjából fontos sejtcentrumok koordinátáit a program elmenti.

Az elemzés ezt követő lépésében a *MEScreader_1* program ezeket az elmentett koordinátákat használja, hogy képkockánként elemezze a videón a kijelölt sejtközpontok körüli változásokat.

Írtam egy harmadik Matlab függvényt, a *reMapper*-t, hogy eltüntessem a valós színskálán kívüli értékekből eredő hibát, mivel – mint az a *.MESc* fájl *gmap* szintérvérvéből is látszik – a felvétel hiába készült látszólag 16 bites színmélységben, a valós felbontása csak 525 különböző szint tartalmazott, ami megközelítőleg 9 bites mélység, ezt skáláztam újra 8 bites mélységre. Az eredeti programban a fekete így 0, a zöld pedig 255-ös értékű, köztük lineárisan változnak a színekhez rendelt intenzitás értékek az eredeti adatoknak megfelelően. Bár ez a megoldás mérésenként eltérő mértékű adatvesztéssel jár, ez a lépés kiemelkedő fontosságú abban az esetben, ha össze szeretnénk hasonlítani a különböző sejtek

intenzitásváltozásait, hiszen így azonos skálán tudjuk mérni azt minden mérés esetében, így a kiértékelések uniformitása megvalósul.

A sejtközéppont körüli pixelek szín értékeit képkockánként átlagoltam, így tudtam az intenzitásváltozást számszerűsíteni adott képkocka adott sejtjeire. Majd ezt ábrázoltam külön-külön sejtenként, azt követően pedig egyben is.

III. 4. 3. Elektrofiziológiai mérés ismertetése

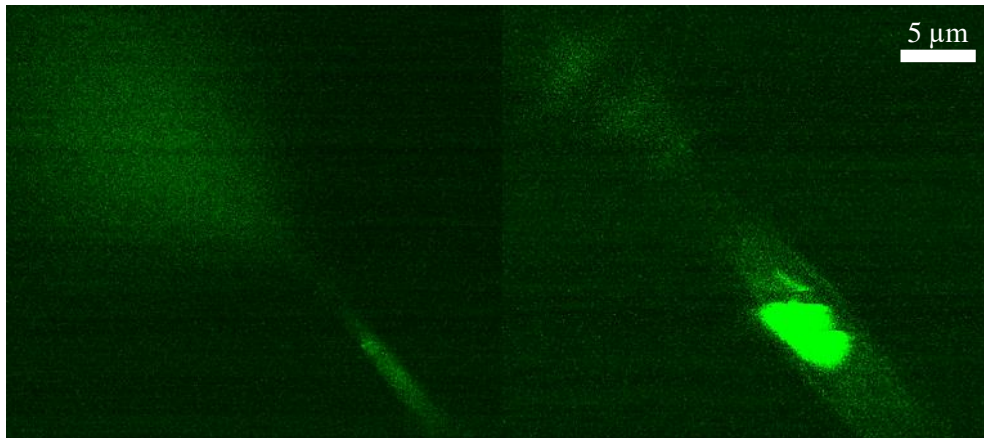
Az elektród által közvetített jelek rögzítése 20 kHz-es mintavételi frekvenciával történt. A regisztráláshoz 32 csatornás Intan RDH2000 erősítőrendszert használtam (Los Angeles, California, Egyesült Államok) [54], mely USB csatlakozón keresztül kapcsolódik a számítógéphez. Az eredmények feldolgozásához és kiértékeléséhez az Intan Technologies honlapjáról letöltött *Matlab_reader* programot használtam [55].

IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

IV. 1. Elektrodbevonat karakterizációja in vitro kétfoton környezetben

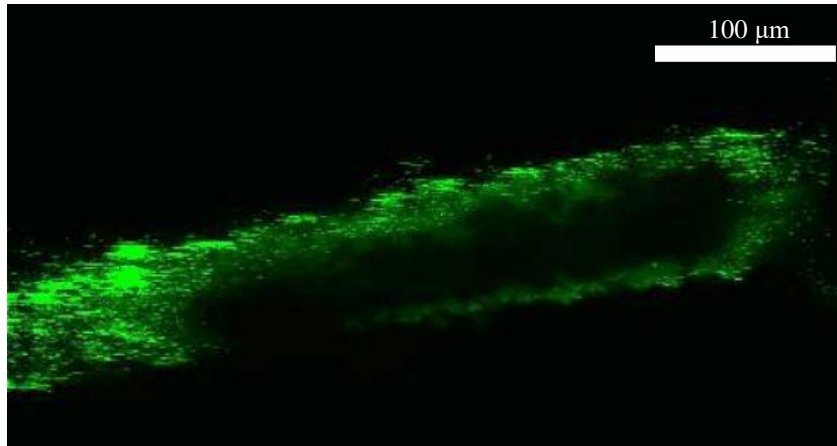
A PEDOT:PSS polimer bevonat alkalmazásával az volt a célom, hogy az általa képzett réteg fluoreszcens tulajdonsága miatt – megfelelő hullámhosszon – kétfoton mikroszkópban láthatóvá tegyem az elektrofiziológiai mérőpontok pontos helyét.

Először pipettába töltve vizsgáltam a vezető polimer fluoreszcens tulajdonságát. A 15. ábrán látható, ahogy a pipettából kiáramlik a fluoreszcens anyag a környezetébe. A mikroszkópiás mérést 700-900 nm között végeztem. A legjobb eredményt – legélesebb képet – 760 nm-en kaptam.



15. ábra: PEDOT:PSS polimer vizsgálata pipettában 760 nm-en;
a bal oldali kép nagyítása a jobb oldali kép.

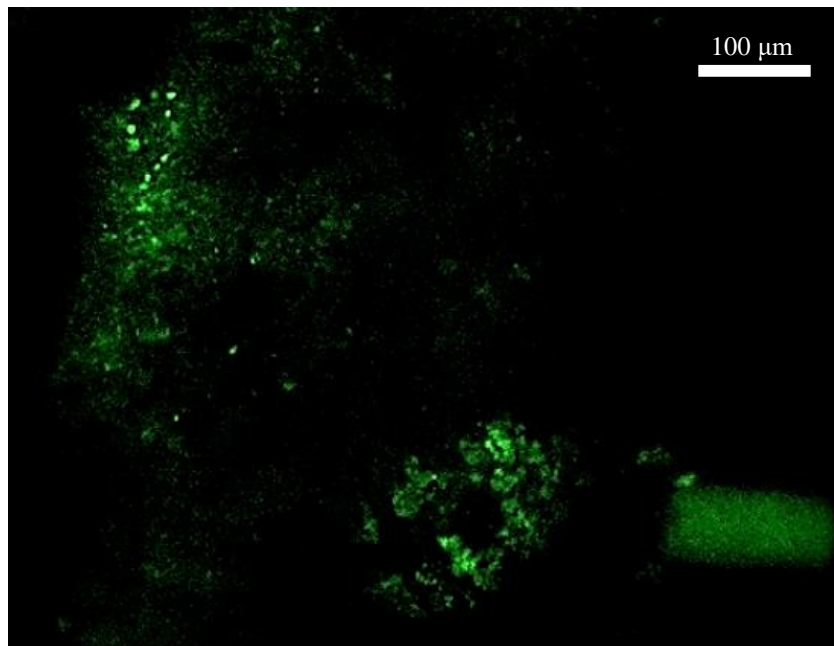
Ezt követően vezetékre leválasztva vizsgáltam a vezető polimert. Szintén 700-900 nm közötti hullámhosszokon végeztem a mérést. A legszebb, az elektródot legtisztábban mutató kép 760 nm-en készült a PEDOT:PSS-sel bevont elektródról (16. ábra).



16. ábra: 760 nm-en vizsgált PEDOT:PSS-sel bevont elektród.

IV. 2. In vivo kétfoton mikroszkópia

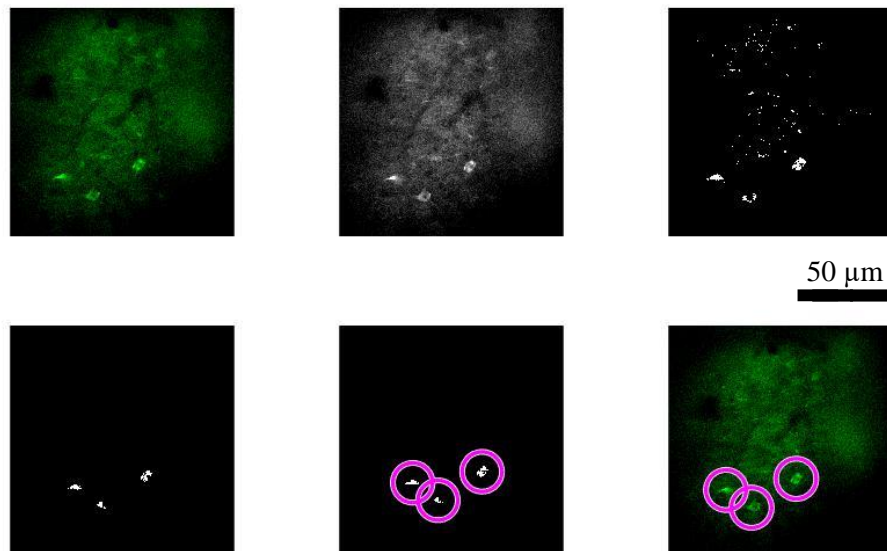
Az in vitro vizsgálatokat in vivo vizsgálatok követték. Nehézsége ezeknek a méréseknek, hogy mivel a rágcsáló altatásban van, megváltozik az agyi aktivitása, így ritkábban detektálhatók a szinapszisok – tehát kevesebbszer villannak fel a neuronok –, mint éber állat esetében. A 17. ábra jobb alsó sarkában látható a PEDOT:PSS-sel bevont elektród, valamint megfigyelhetők a sejtek is a mikroszkópos képen. Mivel a felvétel 940 nm-en készült – mely a transzgénikus egerek sejtjeinek megfigyelésére ideális –, az elektród kevésbé élesen látszik.



17. ábra: In vivo kétfoton mikroszkópos mérés; jobb alsó sarokban az elektród, tőle balra, valamint a bal felső sarokban a sejtek figyelhetők meg.

IV. 2. 1. Matlab környezetben implementált algoritmus alkalmazása a neuronok intenzitásváltozásainak nyomonkövetésére

Az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett algoritmussal az E1 jelölésű egérnek három intenzitásváltozást mutató sejtjét találtam meg. Az intenzitásváltozást mutató sejtek keresésének lépéseit a 18. ábra szemlélteti. Az első – zöld – képen látszik a mikroszkóp eredeti képe, majd ettől jobbra ennek fekete-fehér változata. A felső sor harmadik képén az RGB komponensek szerinti adott zöld érték fölötti foltok láthatóak (*szurozes_zold*). A sejtmag méreténél kisebb méretű foltokat eltüntettem a feldolgozás következő lépésével (*szurozes_kispixikre*), majd a megkeresett sejtmagokat bekereteztem, végül a kereteket ráillesztettem az eredeti képekre. A sejtek koordinátái a 1. táblázatban láthatóak.

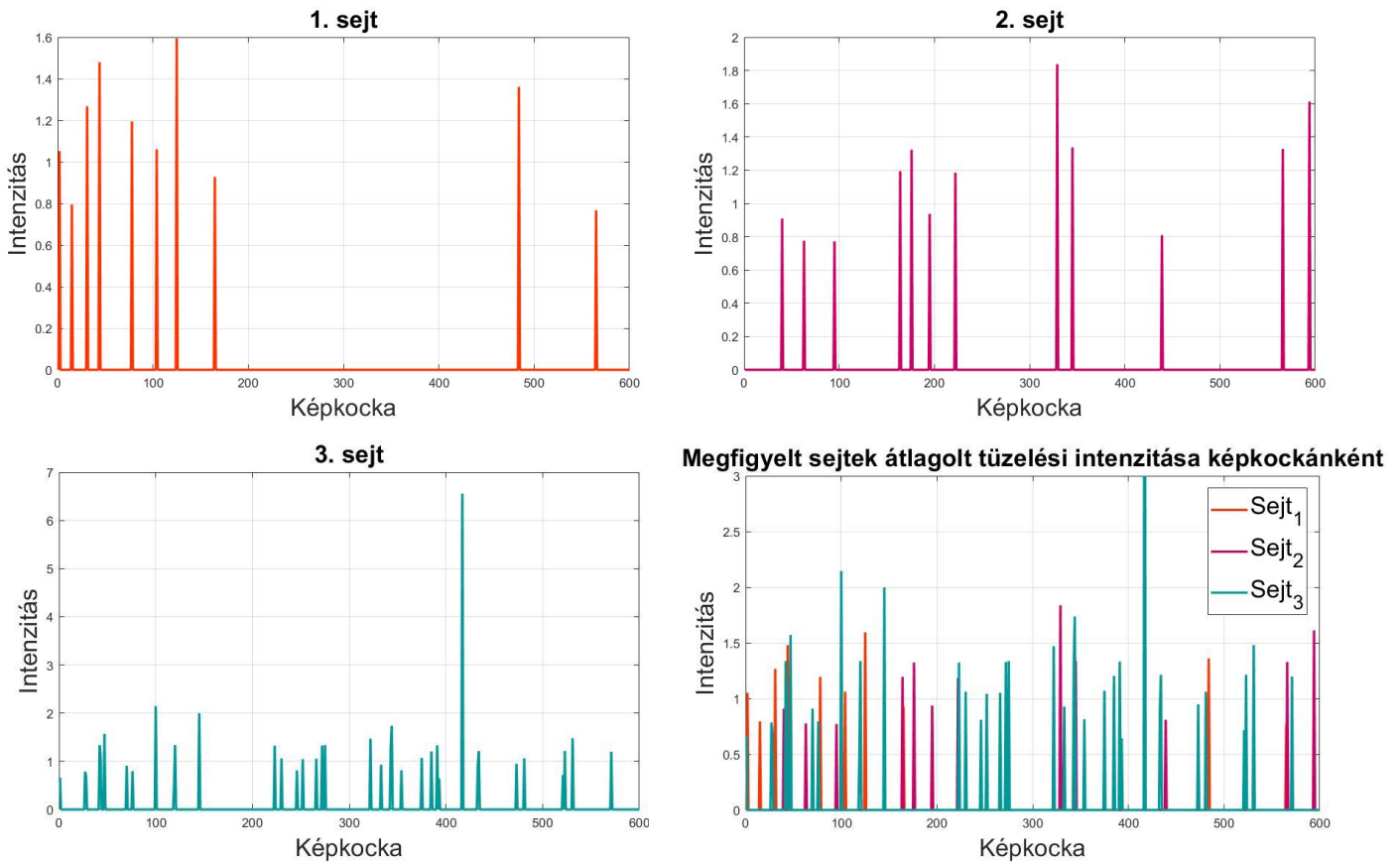


18. ábra: E1 egér intenzitásváltozást mutató sejtjei.

	Centroidok	
	koordináta ₁	koordináta ₂
1. sejt	213,88	287,36
2. sejt	251,96	313,77
3. sejt	318,7	270,63

1. táblázat: Sejtek koordinátái.

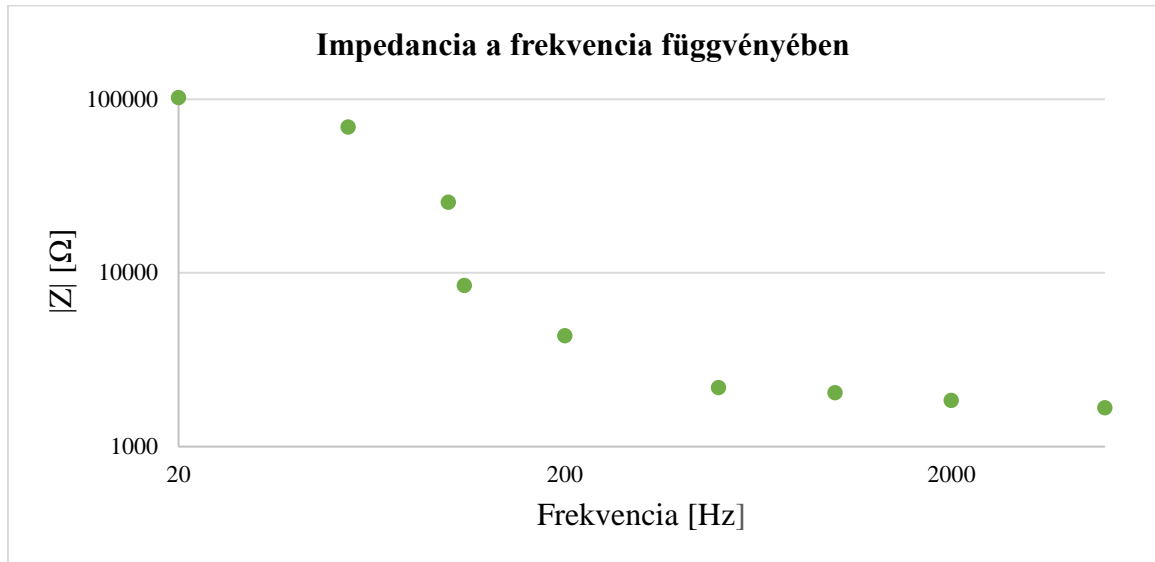
A 19. ábrán E1 sejteinek tüzeléseikor fellépő intenzitásváltozásokat figyelhetjük meg. Észrevehető, hogy a három sejt kevés átfedéssel tüzel egyszerre – hiszen más-más axonokon, dendriteken keresztül érkezik hozzájuk az ingerület –, valamint, hogy igen nagy eltérés van az intenzitásváltozások között. Feltételezhető, hogy a sejtek kapcsolatban vannak egymással térbeli közelségük miatt.



19. ábra: E1 vizsgált sejteinek intenzitásváltozásai képkockánként.

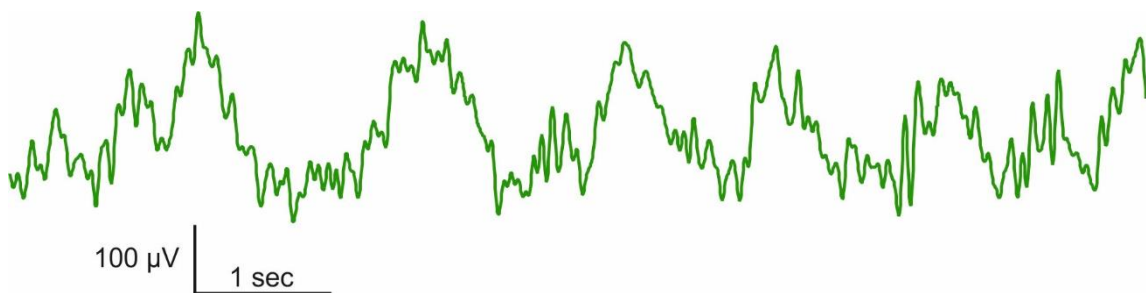
IV. 3. Elektrofiziológiai mérés eredménye

A vezetőpolimernek köszönhetően az eredeti Pt/Ir vezetőréteghez viszonyítva alacsonyabb impedancia értéket (20. ábra), valamint ennek következtében jobb jel-zaj viszonyt kaptam.



20. ábra: Elégően mért impedancia értékek a frekvencia függvényében.

A 21. ábrán megfigyelhetők a lassú agyhullámok, melyek kifejezetten jellemzőek az alvás állapotára. A ketamin-xylazinnal való altatás miatt kialakult a várt 1-1,5 Hz-es oszcilláció. Mint az ábrán látható, az oszcilláció aktív és inaktív fázisokra osztható. Az aktív szakaszokban a neuronok membránjai depolarizáltak, így nagyszámú akciós potenciált generálnak. Az inaktív szakaszokban a sejtmembránok hiperpolarizáltakká válnak, így a sejt aktivitása lecsökken.



21. ábra: Lassú alvási oszcilláció.

IV. 4. Eredmények összesített kiértékelése

Az eredmények alapján elmondható, hogy a módszerek ötvözésével sikeresen létrehoztunk egy olyan mérési eljárást, illetve az eljárás megvalósítását lehetővé tevő rendszert, melyben egyszerre tudjuk követni az agy elektrofiziológiai változásait, valamint optikailag is tudjuk detektálni a sejtek intenzitásváltozásait, miközben az elektród pontos helyét is meg tudjuk határozni a fluoreszcens bevonatnak köszönhetően.

Pozitívuma a PEDOT:PSS rétegnek az eredetinel alacsonyabb impedancia érték és a jobb jel-zaj arányon kívül, hogy a vezető polimer bevonat parallel nyomtatható, tehát a leválasztási technika párhuzamosítható, így megvalósítható nagy mennyiségű, magas kihozatalú gyártása.

Az egyes PEDOT:PSS rétegekkel ellátott elektródokat felhasználva, azokkal mérve, tulajdonságaik közt nem tapasztaltam különbséget.

V. TOVÁBBI LEHETŐSÉGEK

A kutatás folytatásaként célszerű lenne mikro-elektomechanikai rendszerek (microelectromechanical systems, MEMS) alkalmazása az agyi aktivitások megfigyeléséhez, hiszen így lehetőség nyílna a sejtcsoportosulásokban lévő neuronok elkülönítésére [33] a nagy elektródsűrűség miatt. További előnye ezen neurális szenzoroknak a kis méretük és a nagyfokú integritásuk [56].

Szintén előnyös fejlesztési lehetőséget biztosítana mikroprizmák használata a koponyaablak alatt, hiszen így egy-egy idegsejtet végig tudnánk követni a különböző kortikális rétegeken át a prizma fénytörésének köszönhetően [57] [58] [59].

További információkat gyűjthetnénk az agy funkcióiról, valamint a neuronok kapcsolatairól, ha éber oszcillációt tanulmányoznánk a jövőben, szabadonmozgó egerrel való in vivo mérések által [60] [61].

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatomban két agyi aktivitás mérésére alkalmas módszert ötvöztem; az extracelluláris elektródok elektrofiziológiai mérésre alkalmas, valamint a kétfoton mikroszkópia módszerét. A két technológia együttes alkalmazásával az neuronok feszültségváltozásainak mérése közben optikailag is detektálhatjuk azok intenzitásváltozásait.

Az in vivo kísérletsorozathoz GCaMP6f transzgénikus egereket használtam fel – melyek genetikai állományának meghatározása PCR-rel Akadimpex Kft. laborjában (Budapest, Magyarország) történt. A rágsálók neuronjai kétfoton környezetben fluoreszkálnak, ezáltal optikai módszerekkel – de akár szabadszemmel is – követhetőek az agysejtek közti kapcsolatok. Az idegsejtek intenzitásának pontos meghatározására és nyomkövetésére az általam írt Matlab környezetben implementált algoritmust használtam.

Az elektrofiziológiai méréshez elengedhetetlen eszközöket – melyekre PEDOT:PSS fluoreszcens vezető polimer került leválasztásra *Dr. Marek Tamás és kutatócsoportja* által – először in vitro kétfoton környezetben karakterizáltam, majd beültettem azokat a génmódosított egerekbe. A beültetés után az elektród pontos helye az agyszövetben meghatározhatóvá vált a bevonat fluoreszcens tulajdonságának köszönhetően.

A mérések kiértékelése alapján állíthatjuk, hogy a két módszer teljes biztonsággal ötvözhető, általuk pontosabb képet kaphatunk a neuronok aktivitásáról és azok kapcsolatairól. Az elektródra képzett bevonat – várakozásaimnak megfelelően – csökkentette az eszköz impedanciáját és ezáltal javította a mérés során a jel-zaj viszonyt.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezető konzulensemnek, **Dr. Márton Gergelynek** a fáradhatatlan munkáját és türelmét, valamint az MTA TTK KPI 505. csoportjának és hallgatóiknak a sok-sok segítséget.

Köszönettel tartozok tanszéki konzulenseimnek, **Dr. Benyó Balázsnak** és **Dr. Szlávecz Ákosnak** a segítségükért és a keresztkérdéseikért, melyek hozzájárultak dolgozatom strukturáltságához.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, legfőképp Bakos Máténak, Csuhaj Péternek és Emri Ákosnak.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Gelbard-Sagiv, H., Mukamel, R., Harel, M., Malach, R., Fried, I., „Internally generated reactivation of single neurons in human hippocampus during free recall,” *Science*, pp. 322(5898):96-101, 2008.
- [2] Liu, H., Tanaka, N., Stufflebeam, S., Ahlfors, S., Hamalainen, M., „Functional mapping with simultaneous MEG and EEG,” *J Vis Exp*, p. 14(40):1668, 2010.
- [3] Tagliati, M., Shils, J., Sun, C., Alterman, R., „Deep brain stimulation for dystonia,” *Expert Review of Medical Devices*, pp. (1): 33-41, 2004.
- [4] Sugano, H., Shimizu, H., Sunaga, S., „Efficacy of intraoperative electrocorticography for assessing seizure outcomes in intractable epilepsy patients with temporal-lobe-mass lesions,” *Seizure*, pp. 16: 120-127, 2007.
- [5] Okun, M. S., „Deep-brain stimulation for Parkinson's disease,” *The New England Journal of Medicine: Research & Review*, pp. 367(16):1529-38, 2012.
- [6] Rózsa B., Katona G., Lendvai B., Vizi E. Sz., Szipőcs R., „Kétfoton mikroszkópia térben és időben, új mérési módszerek a kétfoton mikroszkópiában,” *MMT absztrakt*, 2004.
- [7] Dana, H., Chen, T-W., Hu, A., Shields, B. C., Guo, C., Looger, L. L., Kim, D. S., Svoboda, K., „Thy1-GCaMP6 Transgenic Mice for Neuronal Population Imaging In Vivo,” *Public Library Of Science ONE*, 2014.
- [8] Prasad, K. P., Chen, Y., Alam Sk, M., Than, A., Wang, Y., Sun, H., Lim, K-H., Xiaochen Dongc, X., Chen, P., „Fluorescent quantum dots derived from PEDOT and their applications in optical imaging and sensing,” *Materials Horizon*, pp. 1:529-534, 2014.
- [9] A. Fonyó, *Az orvosi élettan tankönyve.*, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2011.
- [10] Nicholson, C., Freeman, J. A., „Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum,” *J Neurophysiol, Using Smart Source Parsing Mar*, pp. 38(2):356-68, 1975.
- [11] Jones, M. S., Barth, D. S., „Spatiotemporal organization of fast (>200Hz) electrical oscillations in rat vibrissa/barrel cortex,” *Journal Neurophysiol*, p. 82(3):1599–1609, 1999.
- [12] Rubehn, B., Bosman C., Oostenveld, R., Fries, P., Stieglitz, T., „A MEMS-based flexible multichannel ECoG-electrode array,” *Journal of Neural Engineering*, p. 6(3):036003, 2009.

- [13] Klimesch, W., „EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis.,” *Brain Research Reviews*, p. 29(2–3):169–195, 1999.
- [14] Niedermeyer, F. L., da Silva, E., „Electroencephalography. Basic principles, clinical applications, and related fields.,” *Lippincott Williams & Wilkins*, 2005.
- [15] „Egysejt és neuronpopuláció elvezetés módszerei.,” 2016. [Online]. Available: http://users.itk.ppke.hu/~hakta/segedanyagok/6-szemeszter/ElFiz/eloadasdiak/5_intra_es_extracellularis_elvezetesek.pdf. [Hozzáférés dátuma: 01 10 2017].
- [16] Gray, C. M., Maldonado, P. E., Wilson, M., McNaughton, B., „Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex.,” *Journal of Neuroscience Methods*, pp. vol. 63, pp. 43-54, Dec 1995.
- [17] Márton G., „Újfajta neurofiziológiai multielektrodok fejlesztése és karakterizációja.,” *Doktori értekezés*, 2015.
- [18] Polikov, V. S., Tresco P. A., Reichert W. M., „Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes.,” *Journal of Neuroscience Methods*, pp. 148(1):1 - 18, 2005.
- [19] Cheung, K. C., „Implantable microscale neural interfaces.,” *Biomed Microdevices*, pp. vol. 9, pp. 923-38, 2007.
- [20] Hassler, C., Boretius, T., Stieglitz, T., „Polymers for neural implants.,” *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, pp. 49(1): 18-33, 2011.
- [21] Kozai, T. D., Jaquins-Gerstl, A. S., Vazquez, A. L., Michael, A.C. and Cui, X. T., „Brain tissue responses to neural implants impact signal sensitivity and intervention strategies.,” *ACS chemical neuroscience*, pp. 6(1): 48-67, 2015.
- [22] Ejserholm, F., Kohler, P., Bengtsson, M., Jorntell, H., Schouenborg, J., Wallman, L., „A polymer based electrode array for recordings in the cerebellum.,” in *In Proceedings of the 2011 5th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)*, Cancun, Mexico, 27 April- 1 May 2011.
- [23] Ravichandran, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J. R., Mukherjee, S., Ramakrishna, S., „Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering.,” *J. R. Soc. Interface*, pp. 7:S559-S579, 2010.
- [24] Cui, M. X., Wilerb, J., Dzamanb, M., Altschulerb, R. A., Martin, D. C., „In vivo studies of polypyrrolle/peptid coated neural probes.,” *Biomaterials*, pp. 24:77-787, 2003.

- [25] Green, R. A., Lovell, N. H., Wallace, G. G., Poole-Warren, L. A., „Conducting polymers for neural interfaces: Challenges in developing an effective long-term implant.,” *Biomaterials*, pp. 29(24-25):3393-9, 2008.
- [26] Cui, X., Martin, D. C., „Electrochemical deposition and characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on neural microelectrode arrays.,” *Sensors and Actuators B: Chemical.*, pp. 92-102, 2003.
- [27] Ludwig, K. A., Uram, J. D., Yang, J., Martin, D. C., Kipke, D. R., „Chronic neural recordings using silicon microelectrode arrays electrochemically deposited with poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film.,” *Journal of Neural Engineering*, pp. 3(1):59-70, 2006.
- [28] Cui, X., Lee, V. A., Wiler, J. A., Hetke, J. F., Anderson, D. J., Martin, D. C., „Surface modification of neural recording electrodes with conducting polymer/biomolecule blends.,” *Journal of Biomed Mater Res.*, pp. 56(2):261-72, 2001.
- [29] Abidian, M. R., Martin, D. C., „Experimental and theoretical characterization of implantable neural microelectrodes modified with conducting polymer nanotubes.,” *Biomaterials*, pp. 29(9):1273-1283, 2008.
- [30] George, P. M., Lyckman, A. W., LaVan, D. A., Hedge, A., Leung, Y., Avasare, R., Testa, C., Alexander, P. M., Langer, R., Sur, M., „Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics.,” *Biomaterials*, pp. 26(17):3511-3519, 2005.
- [31] Campbell, A., Mutch, S-E., Faria, J. C. D., Wang, X., Vysokov, N., Degenaar, P., Bradley, D. D. C., „A preliminary study of vapour-phase polymerized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) as a transparent neural electrode.,” *IEEE SENSORS*, 2011.
- [32] Andrásfaly B., Galinanes, G. L., Huber, D., Barbic, M., Macklin, J. J., Susumu, K., Delehanty, J. B., Huston, A. L., Makara, J. K., Medintz, I. L., „Quantum dot-based multiphoton fluorescent pipettes for targeted neuronal electrophysiology.,” *Nature Methods*, pp. 1237-1241, 2014.
- [33] Buzsáki, G., „Large-scale recording of neuronal ensembles,” *Nat Neurosci*, pp. vol. 7, pp. 446-51, May 2004.
- [34] Lendvai B., „Kétfoton pásztázó lézermikroszkópia, Modern képalkotó eljárások a gyógyszerhatásokvizsgálatában.,” *Természet Világa, Idegtudomány Különszám*, Dec 2006.
- [35] Kozai, T. D. Y., Jaquins-Gerstl, A. S., Vazquez, A. L., Michael, A. C., Cui, X. T., „Dexamethasone retrodialysis attenuates microglial response to implanted in vivo.,” *Biomaterials*, pp. 157-169, 2016.
- [36] Nimmerjahn, A., Helmchen, F., „In vivo labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101).,” *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012.

- [37] Rózsa J. B., „Hippokampális interneuronok dendritikus Ca²⁺ szignalizációjának mérése 2-foton pásztázó mikroszkóp technológiával,” *Doktori értekezés*, 2006.
- [38] Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. and Tank, D. W., „In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons,” *Nature*, pp. 385: 161-165, 1997.
- [39] Svoboda, K., Helmchen, F., Denk, W., Tank, D. W., „Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex in vivo,” *Nat Neurosci*, pp. 2: 65-73, 1999.
- [40] Shimomura, O., „Discovery of green fluorescent protein, GFP,” *Nobel Lecture*, 2008.
- [41] Mank, M., Ferrao Santos, A., Direnberger, S., Mrcic-Flogel, T. D., Hofer, S. B., Stein, V., Hendel, T., Reiff, D. F., Levelt, C., Borst, A., Bonhoeffer, T., Hübener, M., Griesbeck, O., „A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging,” *Nature Methods*, 2008.
- [42] Kim, D. S., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., „Engineering Fluorescent Calcium Sensor Proteins for Imaging Neural Activity,” *Society of Neuroscience*, 2014.
- [43] Bodrogkői Zs., „Ideghálózatok vizsgálata,” [Online]. Available: <http://web.med.u-szeged.hu/mbio/hun/anyagok/2012-2013/2.felev/smge/14/2.%20Ideghalozatok%20vizsgalata-word.pdf>. [Hozzáférés dátuma: 07. 12. 2016.].
- [44] Harmat V., Karancsiné Menyhárd D., „A kalmódulin és kismolekulás komplexei; Szerkezet alapú gyógyszertervezés,” [Online]. Available: <http://www.termesztvilaga.hu/tv9710/kalmod.html>. [Hozzáférés dátuma: 07. 12. 2016.].
- [45] „The Jackson Laboratory,” [Online]. Available: <https://www.jax.org/strain/025393#jump-nav-2>. [Hozzáférés dátuma: 21. 10. 2017.].
- [46] Chen, T-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., Kim, D. S., „Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity,” *Nature*, 2013.
- [47] „California Fine Wire Company,” [Online]. Available: <http://www.calfinewire.com/datasheets/100168-platinum20iridium.html>. [Hozzáférés dátuma: 17. 10. 2017.].
- [48] Ye, L., Haroon, M. A., Salinas, A., Paukert, „Comparison of GCaMP3 and GCaMP6f for studying astrocyte Ca²⁺ dynamics in the awake mouse brain,” *PLOS ONE*, 2017.
- [49] Che, Q., Cichon, J., Wang, W., Qui, L., Lee, S-J. R., Campbell, N. R., DeStefino, N., Goard, M. J., Fu, Z., Yasuda, R., Looger, L. L., Arenkiel, B. R., Gan, W-B., Feng, G., „Imaging Neural Activity Using Thy1-GCaMP Transgenic Mice,” *NeuroResource*, pp. 297-308, 2012.

- [50] Chang, S-P., Opsahl, M. L., Whitelaw, C. B. A., Morley, S. D., West, J. D., „Relative transgene expression frequencies in homozygous versus hemizygous transgenic mice,” *Transgenic Res.*, 2013.
- [51] „Form 2 3D printer,” [Online]. Available: <https://formlabs.com/3d-printers/form-2/>. [Hozzáférés dátuma: 26. 10. 2017.].
- [52] „Vertex Dental,” [Online]. Available: <http://www.vertex-dental.com/en/products/19-en/26/155-vertex-self-curing/>. [Hozzáférés dátuma: 22. 10. 2017.].
- [53] „Femtonics,” [Online]. Available: <http://femtonics.eu/products/femto2d-galvo>. [Hozzáférés dátuma: 23. 10. 2017.].
- [54] „Intan Technologies,” [Online]. Available: http://intantech.com/products_RHD2000.html. [Hozzáférés dátuma: 23. 10. 2017.].
- [55] „Intan Recording System Software, MATLAB m-file functions,” [Online]. Available: <http://intantech.com/downloads.html>. [Hozzáférés dátuma: 26. 10. 2017.].
- [56] Lyshevski, S. E., „Nano- and Microelectromechanical Systems,” *CRC Press*, pp. ISBN 0-8493-0916-6, 2000.
- [57] Chia, T. H.; Levene, M. J., „In vivo Imaging of Deep Cortical Layers using Microprism,” *Journal of Visualized Experiments*, pp. 1-7, 2009.
- [58] Low, R. J.; Gu, Y.; Tank, D. W., „Cellular resolution optical access to brain regions in fissures: Imaging medial prefrontal cortex and grid cells in entorhinal cortex,” *PNAS*, %1. kötet111, pp. 18739-18744, 2014.
- [59] Wenzel, M.; Hamm, J. P.; Peterka, D. S.; Yuste, R., „Reliable and Elastic Propagation of Cortical Seizures In Vivo,” *Cell Reports*, pp. 2681-2693, 2017.
- [60] Haider, B.; Hausser, M.; Carandini, M., „Inhibition dominates sensory responses in the awake cortex,” *Nature*, pp. 97-102, 2013.
- [61] Silasi, G.; Xiao, D.; Vanni, M. P.; Chen, A. C. N.; Murphy, T. H., „Intact skull chronic windows for mesoscopic wide-field imaging in awake mice,” *Journal of Neuroscience Methods*, pp. 141-149, 2016.
- [62] Sakmann, B. and Neher, E., „Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes,” *Annu Rev Physiol*, pp. vol. 46, pp. 455-72, 1984.

VIII. ÁBRÁK JEGYZÉKE

- [K1] Jorfi, M., Skousen, J. L., Weder, C., Capadona, J. R.: Progress towards biocompatible intracortical microelectrodes for neural interfacing applications. *Journal of Neural Engineering*, 12 (2015) 011001 (45pp), 2014.
- [K2a] Cheung, K. C., Renaud, P., Tanila, H., Djupsund, K.: Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8):1783-1790, 2007.
- [K2b] Ochoa, M., Wei, P., Wolley, A. J., Otto, K. J., Ziaie, B.: A Hybrid PDMS-Parylene Subdural Multi-Electrode Array. *Biomed Microdrives*, 15(3):437-443, 2013.
- [K3] Janáky Cs.: Elektromosan vezető polimerek mágneses nanorészecskékkel alkotott kompozitja. *Doktori értekezés*, 2010.
- [K4] Andrásfaly B., Galinanes, G. L., Huber, D., Barbic, M., Macklin, J. J., Susumu, K., Delehanty, J. B., Huston, A. L., Makara, J. K., Medintz, I. L.: Quantum dot-based multiphoton fluorescent pipettes for targeted neuronal electrophysiology. *Nature Methods*, 1237-1241, 2014.
- [K5] Wu, F., Stark, E., Im, M., Cho, I-J., Yoon, E-S., Buzsáki Gy., Wise, K. D., Yoon, E.: An implantable neural probe with monolithically integrated dielectric waveguide and recording electrodes for optogenetics applications. *Journal of Neural Engineering*, 10(2013)056012 (9pp), 2013. alapján módosítva.
- [K6] Rózsa B., Katona G., Lendvai B., Vizi E. Sz., Szipócs R.: Kétfoton mikroszkópia térben és időben, új mérési módszerek a kétfoton mikroszkópiában. *MMT absztrakt*, 2004.
- [K8] Dana, H., Chen, T-W., Hu, A., Shields, B. C., Guo, C., Looger, L. L., Kim, D. S., Svoboda, K.: „*Thy1*-GCaMP6 Transgenic Mice for Neuronal Population Imaging In Vivo”, *Public Library Of Science ONE*, 2014.

IX. FÜGGELÉK

Függelék_1: Öröklődés vizsgálatának, valamint az egerek tenyésztésnek menete

Az öröklődési menet vizsgálatához ismernünk kell az öröklődési szabályokat, avagy a Mendeli genetika szabályait, valamint az alapvető fogalmakat is.

Heterozigóta: Az élőlény két homológ kromoszómáján egymástól eltérő gének hordoz. Azaz a genotípus Aa.

Hemizigóta: Diploid élőlényben egy olyan gén, mely csak egy példányban van jelen (pl. az X-hez kötött gének a hím emlősökben).

Homozigóta: Az élőlény két homológ kromoszómáján egymással azonos, egy adott öröklődésre jellemző gének hordoz. Azaz a genotípus AA vagy aa.

A transzgénikus élőlények öröklésmenetének szabályai már ismertek.

A transzgént a pronukleóluszba fecskendezik, mely egy újonnan megtermékenyített petesejtben van. A transzgén befecskendezése a hím és nőstény pronukleólusz egyesítése előtt történik.

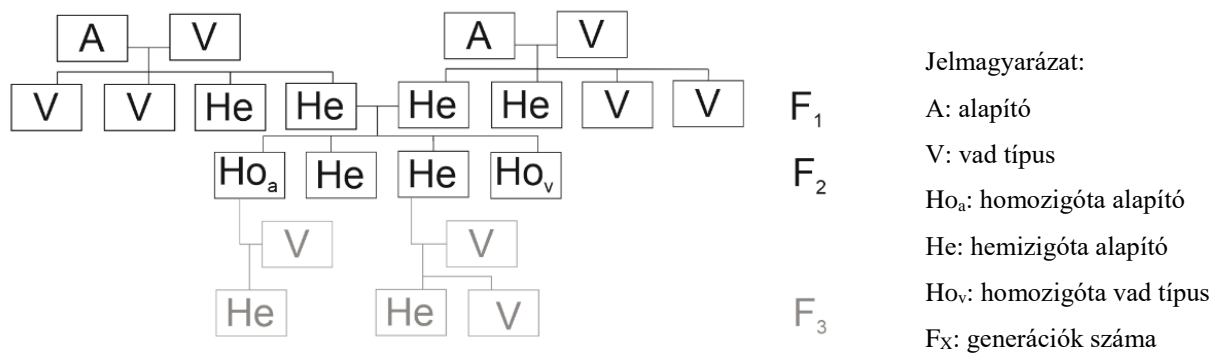
Az így születendő utódok mindannyian hordozni fogják egy génmásolatban a petesejt genetikai információját. Ezeket az egyedeket nevezzük alapítónak.

A következő lépésben (F1 generáció) a már kitenyésztett alapítókat párosítják vad típusú (normál) egyedekkel. A párosítás utódai 1:1 arányban lesznek alapítók, valamint vad típusúak.

Ezutáni lépésként két F1 generációs pozitív, avagy hemizigótát párosítanak össze, mely tenyésztési lépés eredményeként 1:2:1 arányban transzgénnel felszerelt homozigótát, hemizigótát, normál (vad típusú) homozigótát eredményez (F2 generáció).

Az F3 generációt úgy kapták, hogy az F2 generáció állatait normál, vad típusú egyedekkel párosították, így két lehetséges kimenetelt kaptak:

1. Amennyiben hemizigótákat párosítottak vad típusú egyedekkel, akkor 1:1 arányban vissza is kapták a két génekészletet az utódok között.
2. Azonban, ha homozigótákat párosítottak vad típusú egyedekkel, akkor minden leszármazott hemizigóta lett (F1. ábra).



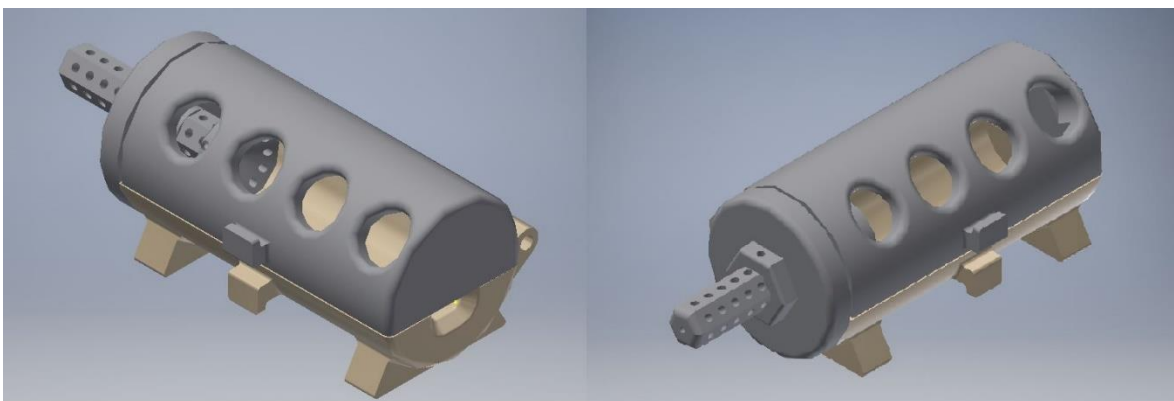
F1. ábra: Egerek öröklésmenete, családfája, melyen feketével vannak jelölve a már kitenyésztett egerek, és szürkével a tervezett szaporítási útvonal.

Függelék_2: Tetoválódoboz tervezése Autodesk Inventor-ban

Az egerek jelöléséhez, valamint a PCR-es mintavételezéshez szükség volt egy olyan doboz megtervezésére, melybe a bódított állatok stabilan befoghatók. A dobozt Autodesk Inventorban terveztem. Három különálló alkatrészből áll; a henger alsó és felső részéből, valamint a dugattyúból, mellyel a rágcsáló méretéhez állítható a doboz hossza.

A doboz palástján lyukakat helyeztem el, hogy a jelölés és mintavétel során is figyelni tudjam az állat ébrenléti állapotát, valamint légzésének egyenletességét.

A dugattyúval átellenes oldalon egy kisebb lyukat szerkesztettem, melyen keresztül a rágcsáló farka kihúzható a dobozból, így elvégezhető azon mind a jelölés, mind a mintavétel.



F2. ábra: 3D nyomtatott doboz tervezete Autodesk Inventor programban.

Függelék_3: Matlab környezetben írt kód – Sejtkereső algoritmus

https://matlab.mathworks.com/users/kingareka/Published/MEScReader_1/index.html

https://matlab.mathworks.com/users/kingareka/Published/intenzitas_algoritmus/index.html

<https://matlab.mathworks.com/users/kingareka/Published/reMapper/index.html>

<https://matlab.mathworks.com/users/kingareka/Published/findAttrib/index.html>

Kétfoton mikroszkóp felvétele:

<https://www.dropbox.com/sh/mxzxflr6l3fa7k0/AACH4InTE-KxGIvqaot258xZa?dl=0>

X. MELLÉKLET

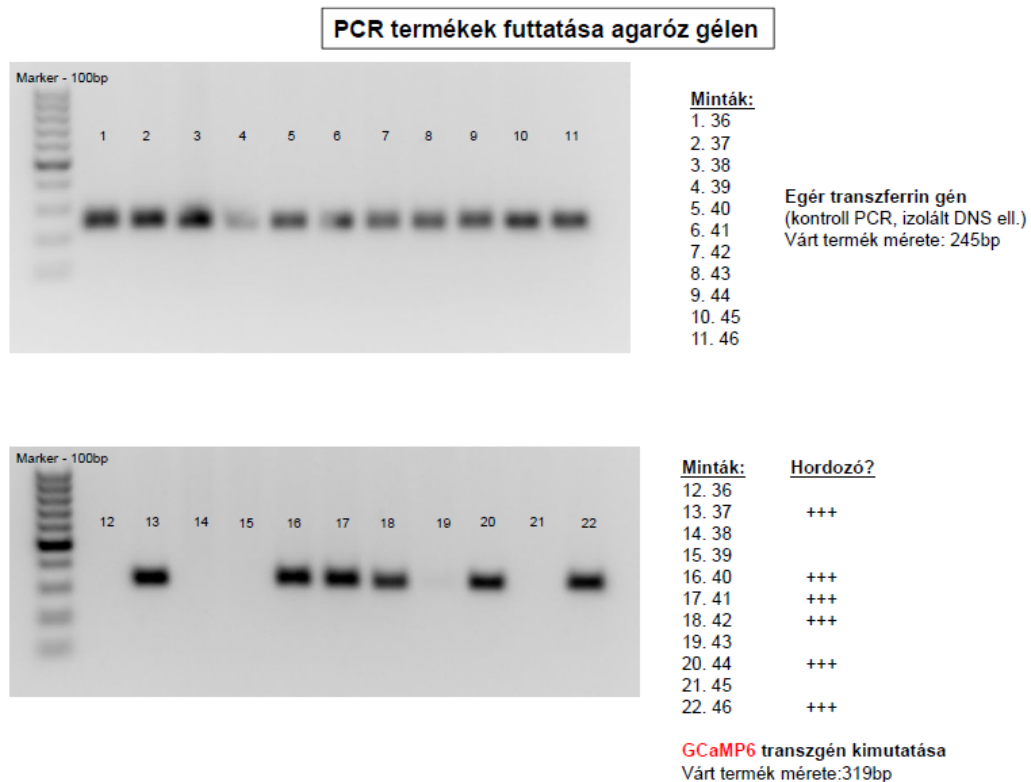
Melléklet_1: Polimeráz láncreakció

Ahhoz, hogy meg tudjuk állapítani, hogy a tenyésztett egerek transzgénikus homo-, hemizigóták vagy vad típusú homozigóták polimeráz láncreakcióval (PCR-rel) kell vizsgálnunk őket, mivel ez a technológia lehetővé teszi egy speciális DNS fragment (gén) vizsgálatát.

A PCR során egy kiválasztott DNS szakasz *in vitro* körülmények között történő enzimes replikációja történik. A reakciók ismétlődésével az adott DNS szekvencia felszaporítása (amplifikációja) érhető el. A folyamat minden ciklusában a DNS mennyisége megduplázódik. A keletkezett rövid (néhány száz bázispár méretű) DNS fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel elválasztva a genomra jellemző mintázatot adnak (*M1. ábra*).

Fontos, hogy a polimeráz láncreakcióban a célszekvenciának 100-1000 bázispárnak kell lennie, valamint, hogy a technológia 5000 bázispárnál hosszabb szekvencia megsokszorozására nem alkalmas.

A PCR Akadimpex Kft. laborjában (Budapest, Magyarország) történt.



M1. ábra: Gélelektroforézis elválasztás utáni genomra jellemző mintázat.