

Mikko Hakala

Kokonaisen kudoksen kuvantaminen iDISCO- menetelmällä ja vertailu kudოსleikkeisiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

29.11.2016

Tekijä(t)	Mikko Hakala
Otsikko	Kokonaisen kudoksen kuvantaminen iDISCO-menetelmällä ja vertailu kudosleikkeisin
Sivumäärä	29 sivua + 1 liite
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Tutkijatohtori Teemu Aitta-aho Lehtori Tiina Soininen
<p>Kudoksia on perinteisesti tutkittu valmistamalla ohuita kudosleikkeitä, jotka käsiteltyinä tai käsittelemättöminä on kuvannettu eri mikroskooppisin menetelmin. Näin saadut kaksiulotteiset kuvat ovat helppoja työstää, mutta kokonaiskäsitys esimerkiksi hermoratojen tarkasta rakenteesta ja sijainnista on jäänyt vaillinnaiseksi. Vaihtoehtona kudosleikkeiden valmistamiselle on kokonaisen kudoksen kirkastaminen, vasta-ainekäsittely sekä kuvantaminen.</p> <p>Tässä opinnäytetyössä keskityttiin tutkimaan kokonaisen kudoksen kirkastamista, vasta-ainekäsittelyä, kuvantamista sekä tekniikkaan liittyviä etuja ja rajoituksia. Tutkimuseläiminä käytettiin hiiriä, joiden PPT-aivoalueelle injisoitiin AAV-CamKIIa-hM3Dq-mCherry -virusta. Viruksessa olevan mCherry-väriaineen kulkeutumista aivoissa tutkittiin kirkastamalla kokonaiset aivot iDISCO-menetelmällä, jolloin valotasomikroskooppia käyttämällä saatiin rakennettua kolmiulotteinen malli aivoista sekä havaittua fluoresoivan proteiinin kulkeutuminen. Vertailun vuoksi valmistettiin perinteisiä kudosleikkeitä, joita verrattiin iDISCO-käsiteltyihin aivoihin.</p> <p>Työ suoritettiin Helsingin yliopiston Farmakologian osastolla ja näytteet kuvattiin Saksan Bonnissa Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen -instituutissa (DZNE).</p>	
Avainsanat	Kuvantaminen, iDISCO, kirkastus, valotasomikroskooppi

Author(s)	Mikko Hakala
Title	Whole brain imaging using the iDISCO method and comparison to tissue sectioning
Number of Pages	29 pages + 1 appendix
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	
Instructor(s)	Teemu Aitta-aho, Postdoctoral Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>Traditionally biological tissues have been studied by tissue sectioning followed by microscopy imaging. These two-dimensional images are easy to produce, but the complete picture of the anatomy and location of neural pathways can be insufficient. An alternative is to use the whole-brain clearing method with immunohistochemistry and imaging.</p> <p>In this thesis, the focus is on clearing the tissue samples, immunohistochemistry, imaging and comparison to traditional tissue slices. Mouse brains at brain stem PPT region were injected with AAV-CamKIIa-hM3Dq-mCherry -virus and the expression was determined by using mCherry-compatible antibodies. The mouse brains were cleared using the iDISCO-method, and by using a light sheet microscope, a 3D-reconstruction was made to study the projections of the mCherry-protein. Also the advantages and disadvantages of the iDISCO-method were evaluated.</p> <p>The thesis was done at the Department of Pharmacology in the University of Helsinki, and the samples were imaged at Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) in Bonn, Germany.</p>	
Keywords	Imaging, iDISCO, Clearing, Light Sheet Microscope

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Projektioiden kuvantaminen aivoissa	2
2.1	Aivoalueet	2
2.2	Kudosleikkeet ja kolmiulotteinen kuvantaminen	2
2.3	Kuvantaminen	5
2.3.1	CLARITY	5
2.3.2	ScaleS	6
2.3.3	CUBIC	7
3	iDISCO	8
3.1	Perfusointi ja esikäsittely	9
3.2	Vasta-ainevärjäys	9
3.3	Kirkastaminen	10
4	Mikroskooppikuvaaminen	11
4.1	Yleisesti	11
4.2	Valotasomikroskooppi	11
5	Työn suoritus	18
5.1	Näytteet	18
5.2	iDISCO:n näytekäsittelyn optimointi	21
6	Tulokset	22
6.1.1	Leikkeet	22
6.1.2	Kirkastetut aivot	24
7	Yhteenveto	28
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. iDISCO-protokolla	

Lyhenteet

AAV	Adeno-associated virus, virustyyppi
CNO	Clozapine-N-oxide, lääkeaine
DBE	Dibentsyylieetteri
DREADD	Designer receptors exclusively activated by designer drugs, mekanismi
iDISCO	Immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent cleared organs, kuvantamismenetelmä
IHC	Immunohistochemistry, immunohistokemia
LDT	Laterodorsal Tegmentum, aivoalue
PBS	Phosphate-buffered saline, puskuriliuos
PFA	Paraformaldehydi
PPT	Pedunculo pontine Tegmentum, aivoalue
THF	Tetrahydrofuraani

1 Johdanto

Glutamaatti on pääasiallinen kiihdyttävä välittäjäaine selkärankaisten keskushermostossa. Sillä on tärkeä rooli signaalinvälityksessä, ja se liittyy läheisesti oppimista vaativiin toimintoihin sekä muistin toimintaan (Daniels ym. 2008: 131-132). Glutamaattireseptorien toimintaa voidaan tutkia aivokudoksen vasta-ainevärjäyksellä sekä aivojen kuvantamisella. Tässä opinnäytetyössä keskitytään tutkimaan kokonaisen aivokudoksen kuvantamista, jolloin saadaan rakennettua kolmiulotteinen malli, jolla on mahdollista määrittää eri aivoalueille suuntautuvia hermosoluyhteyksiä eli projektioita.

Fluoresoivia proteiineja, transduktoituja sekä immunovärjättyjä, on mahdollista tutkia valmistamalla perinteisiä kudosleikkeitä. Tämän tekniikan etuna on sen nopeus sekä yksinkertaisuus, mutta tässä opinnäytetyössä keskitytään kokonaisen kudoksen kirkastamiseen, immunovärjäykseen, kuvantamiseen sekä kolmiulotteisen mallin rakentamiseen. Uusien menetelmien suurimpana etuna on kokonaisvaltainen ymmärrys esimerkiksi viejähaarakkeista sekä tuntemattomien projektoiden selvittäminen tarkasti. Lisäksi tehdään vertailua perinteisiin kudosleikkeisiin ja selvitetään eri menetelmien hyötyjä sekä haasteita.

Insinööriö suoritettiin Helsingin yliopiston Farmakologian osastolla. Ohjaajana toimivat tutkijatohtori Teemu Aitta-aho Helsingin yliopistosta sekä lehtori Tiina Soininen Metropolia Ammattikorkeakoulusta.

2 Projektioiden kuvantaminen aivoissa

2.1 Aivoalueet

Aivot on hyvin monimutkainen elin, jonka rakennetta on mahdollista havainnollistaa aivoatlaksen avulla. Aivoatlas on kartta aivoista, jossa on koordinaattien perusteella mahdollista osoittaa tiettyjä aivoalueita. Koordinaatisto on kolmiulotteinen, ja se jaetaan koronaaliseen, sagitaaliseen sekä horisontaaliseen. Koronaalisesti katsoen liikutaan aivojen etuosasta kohti takaosaa, jolloin aivoalueet tulevat järjestyksessä vastaan. Aloituspisteenä käytetään bregmaa, joka sijaitsee puolessavälissä aivoja. Tässä työssä tärkeimmät aivoalueet ovat PPT (Pedunculopontine Tegmentum) sekä LDT (Laterodorsal Tegmentum). PPT:n sijainti on bregma -4,36 mm, eli alue sijaitsee aivojen takaosassa, 4,36 mm bregmasta. LDT:n sijainti on lähes sama, koska aivoalueet sijaitsevat vierekkäin.

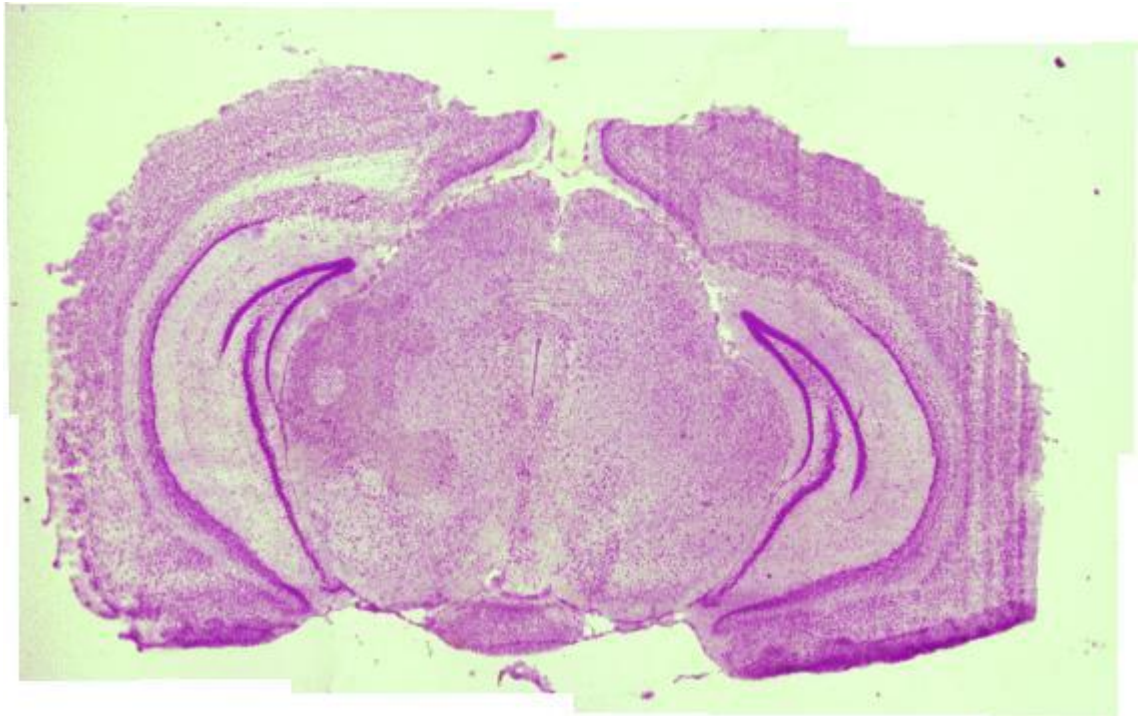
2.2 Kudosleikkeet ja kolmiulotteinen kuvantaminen

Perinteinen tapa tutkia ex vivo -aivokudosta on valmistaa kudosleikkeitä, joille suoritetaan vasta-ainevärjäys. Vasta-aineesta riippuen värjäytyneet kohdesolut pystytään tunnistamaan fluoresenssimikroskopian avulla ja kuvankäsittelyä käyttäen on mahdollista laskea solujen lukumäärä, jotta johtopäätöksiä tekeminen on mahdollista. Lisäksi värjäytystä leikkeistä on mahdollista tutkia solujen kolokalisaatiota kahden eri aallonpituuden fluoresenssin päällekkäisyyttä vertaamalla.

Aluksi tutkittava kudos tulee muokata käsiteltävään muotoon. Jääleikkeitä tehdessä käytetään perfusointia, jossa eläimen verenkiertoon syötetään 4 % paraformaldehydiliuosta (PFA). PFA-käsittelyssä eläin nukutetaan ja sen rintakehään tehdään viilto, jotta sydän saadaan näkyville. Sydämen vasempaan kammioon asetetaan injektioneula ja oikeaan eteiseen tehdään pieni viilto, jonka kautta injektoitu aine sekä veri pääsee poistumaan verenkierrosta. Ensin eläimen veri poistetaan PBS-liuoksella, jonka jälkeen eläimen kudokset saadaan jähmetettyä injektoimalla PFA-liuosta verenkiertoon. Paraformaldehydi polymerisoituu eläimessä ja jähmettää kudokset senhetkiseen tilaansa sekä estää solujen omien entsyymien toiminnan. Käsittelyn

jälkeen eläimen aivot poistetaan ja jäädytetään sekä säilötään syväjäähäpakkastimeen tulevaa jatkokäsittelyä varten (Gage ym. 2012.)

Leikkeitä voidaan valmistaa jäädytettyinä jääleikkeinä tai parafiiniin valettuina parafiinileikkeinä. Jääleikkeiden valmistus ei vaadi enempää käsittelyä, mutta parafiinileikkeitä varten aivot valetaan parafiiniblokkiin, jossa ne säilyvät oikein säilytettynä määräämättömän kauan. Kuvassa 1 näkyy hiiren aivoista tehty jääleike, joka on värjätty tioniinivärjyksellä. Tioniini on väriaine, joka värjää solujen sytoplasman kirkkaan violetiksi. Näkyvä aivoalue sijaitsee keskiosassa aivoja, hieman hippokampuksen jälkeen.



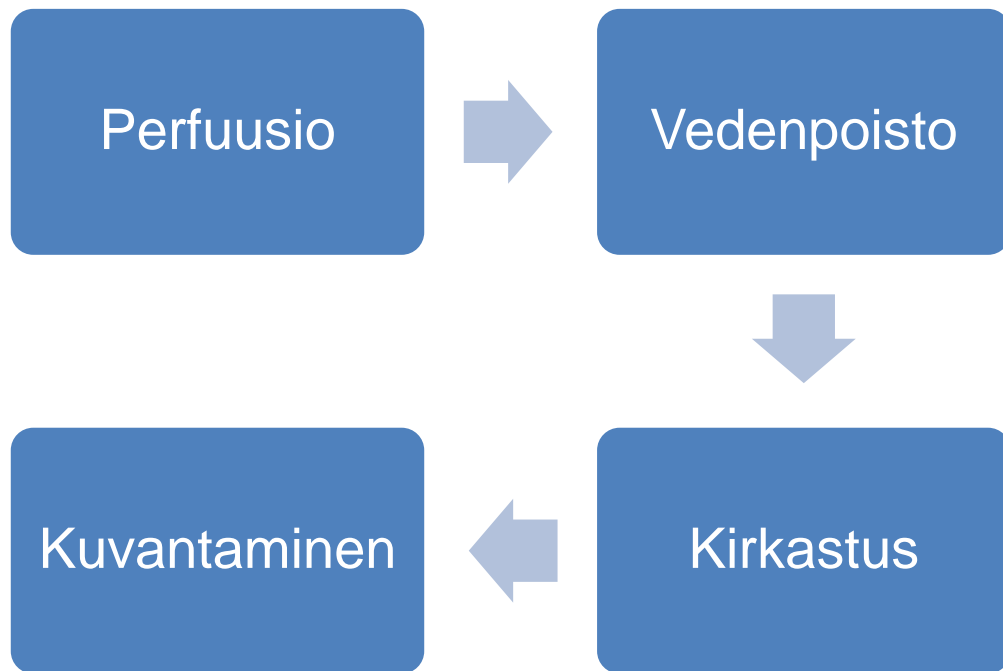
Kuva 1. Tioniinivärjätty 40 μm paksuinen hiiren aivoleike 10-kertaisella suurennoksella, jossa sytoplasma näkyy violetina.

Vasta-ainevärjäystä varten leikkeet tulee siirtää jäätymisenestoaineessa pakkaseen odottamaan värjäystä. Tämän jälkeen valituilla vasta-aineilla saadaan värjättyä halutut solut ja ne pystytään kuvantamaan epifluoresenssimikroskoopilla.

Epifluoresenssimikroskooppi on hyvin yleinen tutkimuksessa käytössä oleva mikroskooppi johtuen sen helppokäyttöisyydestä sekä monipuolisuudesta. Mikroskooppin peruseriaatteena on valonlähde, jotta aallonpituutta pystytään vaihtamaan erillisillä suotimilla. Vasta-aineesta riippuen valitaan sopivin aallonpituus ja näytettä eksitoidaan halutun aallonpituuden valolla. Näytteessä olevat fluoroforit emittoivat tietyn aallonpituuden valoa, joka voidaan havaita okulaareista ja saadaan tallennettua mikroskooppiin liitetyn kameran avulla (Webb & Brown 2012: 29-32.) Suurellakin suurennoksella otetuista kuvista voidaan koota tietokoneavusteisesti yksi yhtenäinen kuva, jolloin näytteestä on helpompi laskea esimerkiksi värjäytyneet solut.

Kudosleikkeiden etuna muihin menetelmiin nähden on ennen kaikkea nopeus. Vasta-ainevärjäyksissä aikaa kuluu kahden inkubaation kanssa kaksi vuorokautta, verrattuna haastavampiin kuvantamismenetelmiin, joissa aikaa saattaa kulua useita viikkoja. Toisaalta leikkeet ovat aina kaksiulotteisia kuvia, jolloin esimerkiksi aksonien kolmiulotteinen hahmottaminen on hyvin vaikeaa. Lisäksi aina leikettä tehdessä leikkaava terä poistaa osan kudoksesta välistä, jolloin olennaisia hermoratoja saattaa jäädä kuvantamatta. Tämän takia on kehitetty useita kolmiulotteisia kuvantamismenetelmiä, joissa koko näyte saadaan kerralla kuvannettua ilman, että kudoksesta jäisi puuttumaan mitään.

Kolmiulotteisissa kuvantamismenetelmissä peruseriaatteena on näytteen saattaminen läpinäkyväksi sekä kuvausta haittaavien lipiden sekä veden poistaminen muuttamatta näytteen morfologiaa tai häivyttämättä tutkittavaa signaalia. Kuvantamiseen on kehitetty useita tekniikoita, mutta peruseriaate on jokaisessa kuvan 2 mukainen.



Kuva 2. Prosessikaavio kirkastettavien näytteiden käsittelystä.

2.3 Kuvantaminen

Kuvantamista varten on kehitetty useita eri menetelmiä, joiden tekniikat eroavat toisistaan merkittävästi. Käytetyimmät menetelmät ovat iDISCO:n lisäksi CLARITY, ScaleS sekä CUBIC, joista jokaisella on omat erityispiirteensä sekä etunsa ja haasteensa.

2.3.1 CLARITY

CLARITY on myös kehitetty kokonaisen kudoksen kirkastamiseen, mutta iDISCO:on verrattuna tässä menetelmässä hyödynnetään elektroforeesia, jolloin varautuneet partikkelit saadaan sähkövirran avulla kulkeutumaan kudoksessa. Kirkastettava kudokse käsitellään hydrogeelillä sekä formaldehydillä, jotka saadaan lämpötilaa nostamalla kulkeutumaan kudokseen. Kyseinen hydrogeeli-formaldehydi -hybridi tukee kudosta sekä syrjäyttää kudoksen alkuperäiset molekyylit, jotka muodostavat solun tukirakenteen. Sähkövirran avulla kudoksessa olevat lipidit saadaan poistettua ja ne

korvataan hydrogeeli-formaldehydi –hybridillä (Chung ym. 2013: 332-335). Yhdistettynä vasta-ainekäsittelyyn, fluoroforeihin sekä valittuun kuvantamismenetelmään CLARITY-tekniikalla saadaan muihin vastaaviin tekniikoihin nähden nopeasti kuvannettua valittujen solujen sijaintia. (Chung & Deisseroth 2013: 508-513)

CLARITY soveltuu monien eri kudosten, kuten aivojen, haiman, maksan sekä keuhkojen kuvantamiseen. Lisäksi CLARITY-tekniikkaa käytettäessä proteiinihävikki on alle 10 %, kun esimerkiksi ScaleS-tekniikassa hävikki on yli 40 %. CLARITY:n haittapuolina ovat hidas kirkastusaika sekä kallis ja spesifinen elektroforeesilaitteisto (Azariapour ym. 2016: 4-9.)

2.3.2 ScaleS

ScaleS-tekniikalla pyritään säilyttämään tutkittava fluoresenssi olemalla käyttämättä korkean konsentraation pesuaineita sekä orgaanisia liuottimia. Sen sijaan käytetään sorbitolia ja ureaa, joiden yhteisvaikutuksella kudoksesta saadaan kirkastettua ja fluoresenssi säilytettyä. ScaleS-tekniikka pohjautuu aiemmin kehitettyyn ScaleA2-tekniikkaan, jossa kirkastavana aineena käytettiin ureaa. Tämän tekniikan heikkoutena ovat sen kahden viikon kirkastuskesto, kudoksen haurastuminen, näytteen turpoaminen sekä immunohistokemiallista leimausta käytettäessä fluoresenssisignaalin heikentyminen. (Hama ym. 2011: 1481-1488.)

Parannuksena ScaleA2:een ScaleS:ssä hyödynnetään sekä urean että sorbitolin kirkastavaa vaikutusta. Lisäksi urean ominaisuutena on kerätä nestettä ja sorbitolin kuivattaa, joten säätelemällä näiden kahden keskinäistä konsentraatiota saadaan suoritettua kudoksen kirkastus, joka ei muuta kudoksen kokoa ja säilyttää fluoresenssisignaalin. (Hama ym. 2015: 1518-1529). Urean ja sorbitolin muodostaman liuottimen taitekerroin on hyvin lähellä veden taitekerrointa, joten kuvaus voidaan suorittaa suurella numeerisella apertuurilla. (Marx, V. 2014: 1209-1214.)

ScaleS-tekniikkaa on käytetty hiiren aivokudoksen sekä alkioiden lisäksi ihmisten aivoihin Alzheimerin tautia tutkittaessa. (Azariapour ym. 2015: 4-5)

2.3.3 CUBIC

CUBIC (Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktail) on menetelmä, joka pohjautuu ScaleS-tekniikkaan. Tekniikassa käytetään peräkkäin kahta reagenssia taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1. CUBIC-menetelmän vaatimat reagenssit

Reagenssi 1	Reagenssi 2
2-hydroksipropyli	Sukroosi
Urea	Trietanoliamiini
Triton X-100	Triton X-100

Ensimmäisen reagenssin funktiona on parantaa kudoksen diffuusiokykyä. Toisella reagenssilla poistetaan jäljelle jääneet lipidit ja asteittain sukroosikonsentraatiota nostamalla 20 %:sta 50 %:iin, saadaan näyte läpinäkyväksi. Reagenssi 1 turvottaa kudosta, mutta reagenssi 2 kutistaa sitä, jolloin näyteen morfologia pysyy likimain muuttumattomana ja edustavana. Immunovärjäys voidaan suorittaa kahden reagenssin käsittelyn välissä ja näin päästään fluoresenssimikroskopiolla jopa 750 mikrometrin kuvaussyvyyteen.

CUBIC:n etuihin voidaan laskea yksinkertainen kirkastamisprotokolla, myrkyttömien reagenssien käyttö eikä erityistä laitteistoa vaadita. Kirkastuksessa kestää noin 14 päivää, mikä on muihin tekniikoihin verrattuna kohtuullisen nopea aika. (Azaripour ym. 2016: 9)

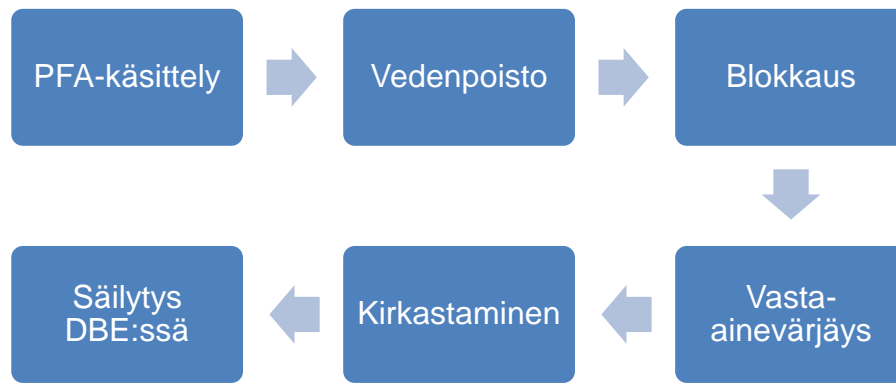
3 iDISCO

iDISCO (Immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent cleared organs) kehitettiin, jotta suuriakin kudoksenäytteitä pystyttäisiin kuvantamaan kokonaisuutena kappaleena ilman leikkeiden valmistusta. Siinä missä kryostaatilla leikkeitä tehdessä kuvattava kohde on hyvin ohut, iDISCO:n avulla saadaan kuvannettua esimerkiksi kokonainen hiiren aivo.

Jotta kokonainen kudos saataisiin kuvattua mikroskoopilla, kudoksesta täytyy saada ensin läpinäkyvä. Kudoksen saattaminen läpinäkyväksi on toteutettu jo 1900-luvun alkupuolella, mutta vasta lähiaikoina tekniikkaa on saatu käytettyä kuvantamisessa (Renier ym. 2014: 896-910). iDISCO ei ole ainoa kokonaiseen kudokseen käytetty tekniikka. Vastaavia ovat 3DISCO (Ertürk ym. 2012: 1983-1995) sekä CLARITY (Chung & Deisseroth 2012: 332-337), joiden perusteella iDISCO on optimoitu. Lisäksi iDISCO-tekniikkaa itsessään muokataan edelleen, jotta vältettäisiin kudoksen kutistuminen sekä sekundääristen vasta-aineiden laimeneminen käytettävissä olevaan liuottimeen.

iDISCO-protokolla on muokattu versio 3DISCO:sta, jossa keskitytään kudoksen kirkastamiseen ja vasta-ainevärjäykseen ilman kolmiulotteista kuvantamista. iDISCO:ssa sen sijaan keskitytään kolmiulotteisen kuvantamisen mahdollisuuteen käyttäen tarkoitukseen sopivaa mikroskopointitekniikkaa. Monivaiheisen protokollan esikäsittelyssä näytettä käsiteltiin paraformaldehydilla, metanolilla sekä pesuaineilla, jotta se saataisiin vasta-ainevärjykselle sopivaan tilaan ja blokkauksessa näytteessä olevien pintaproteiinien toiminta estetään. Vasta-ainevärjäys ja kirkastaminen ovat aikaavievimpiä työvaiheita johtuen pitkistä inkubaatioajoista.

iDISCO-tekniikka valittiin opinnäytetyöhön johtuen sen yksinkertaisesta protokollasta, reagenssien hyvästä saatavuudesta ja koska monimutkaista laitteistoa ei tarvita. Kuvassa 3 on esitetty iDISCO-protokollan perusperiaate.



Kuva 3. iDISCO-käsittelyn prosessikaavio

3.1 Perfusointi ja esikäsittely

Aluksi, aivan kuten kudosleikkeissä, tutkittavan eläimen aivot perfusoidaan 4 % paraformaldehydiliuoksella, eläimen aivot poistetaan ja pestään PBS-liuoksella. Tämän jälkeen näyte käsitellään nousevalla metanolisarjalla, jolloin näytteessä oleva vesi saadaan poistettua. Seuraavaksi näyte nesteytetään laskevalla metanolisarjalla, jossa käytetään PBS-liuosta sekä Triton X-100-pesuliuosta, jotta näytteessä olevat lipidit saadaan huuhdottua pois. Käsittelyyn kuluu yhteensä kaksi työpäivää, mukaan lukien inkubaatiot yön yli. Kaikki vasta-aineet eivät ole yhteensopivia metanolin kanssa, joten iDISCO-protokollasta löytyy vaihtoehtoinen esikäsittelyohje.

3.2 Vasta-ainevärjäys

Ennen vasta-ainevärjäystä käsiteltävät näytteet tulee käsitellä aasin seerumilla, jolla blokataan näytteessä olevat pintaproteiinit, jolloin itse vasta-aineen sitoutumisesta saadaan spesifisempää. Näyte pestään PBS/hepariini-liuoksella ja käsitellään primäärisellä sekä sekundäärisellä vasta-aineella. Huomionarvoista on tarvittava vasta-aineiden määrä: kudosleikkeitä tehdessä tarvittava vasta-aineiden määrä on monta kertaluokkaa pienempi verrattuna kokonaisen aivon immunohistovärjäykseen. Yksittäisen aivon värjäyksen hinta tulee olemaan suhteellisen korkea, verrattuna kryostaatilla tehtyihin leikkeisiin tarkasti määrättyllä aivoalueella.

3.3 Kirkastaminen

Kirkastus suoritetaan käyttämällä tetrahydrofuraania (THF) sekä dibentsyylieetteriä (DBE). Näiden liuottimien tarkoitus on kirkastaa kudosisäilytystä hävittämättä fluoresoivaa signaalia tarkasteltavista soluista. Tetrahydrofuraani poistaa veden tutkittavasta näytteestä, mutta samalla se poistaa osan lipideistä. Yhteisvaikutuksena kudoksesta tulee hyvin heterogeeninen ja taitekertoimeksi tulee yli 1,5 (suurempi kuin vedellä tai lipideillä). Tämän johdosta näyte tulee käsitellä dibentsyylieetterillä, joka liuottaa jäljelle jääneet lipidit kudoksesta ja tekee siitä homogeenisen. Lisäksi kudoksen ja liuottimen taitekerroin saadaan yhteensopivaksi kuvausta varten (Richardson & Lichtman, 2015: 251-254). iDISCO:n etuihin voidaan laskea sen yksinkertainen sekä pelkistetty protokolla. CLARITY-tekniikkaan verrattuna laitteisto on hyvin minimaalinen, mutta inkubaatioajat ovat hyvin pitkiä ja näytteen koosta riippuen, vasta-ainevärjäys ja kirkastaminen vievät 8–18 päivää (Renier ym. 2014: 896-910). Kuvassa 4 on asetettu rinnakkain perfusoitu kirkastamaton aivo sekä iDISCO-kirkastettu. Huomionarvoista kuvassa on kirkastettujen aivojen suhteellisen koon pieneneminen sekä tummat samentumat. Kyseiset samentumat kirkastuvat, kun aivoja säilytetään pidempään dibentsyylieetterissä.



Kuva 4. Vasemmalla perfusoitu kirkastamaton aivo ja oikealla iDISCO-käsitelty kirkastettu aivo.

iDISCO soveltuu hyvin aivojen kuvantamiseen, koska tetrahydrofuraanilla pystytään kirkastamaan myeliinikudosta ja kirkastaminen voidaan suorittaa suhteellisen suurille kudoksenäytteille, halkaisijaltaan 1,5–2 senttimetriä. Heikkoutena iDISCO-menetelmässä on kudoksen kutistuminen sekä fluoresenssin katoaminen. Tetrahydrofuraanilla on ominaisuutena kudoksen kutistaminen, vaikka kudoksen sisäiset mittasuhteet pysyvätkin samana. Viimeisenä kirkastusliuottimena käytetty dibentsyylieetteri tuhoaa ajan kanssa fluoresenssia, joten näyte tulisi kuvantaa hyvin pian kirkastamisen jälkeen. iDISCO:lla pystytään kirkastamaan ainoastaan perfusoituja ja paraformaldehydillä jähmetettyjä näytteitä, joten tämä asettaa tiettyjä rajoituksia näytteiden valinnalle. (Ertürk ym. 2012: 1983-1995)

4 Mikroskooppikuvaaminen

4.1 Yleisesti

Erilaisten näytteiden, kirkastettujen ja kirkastamattomien, kuvaamiseen on olemassa monia tekniikoita. Konfokaalimikroskopiassa laservalo keskitetään hyvin tarkasti kuvattavalle alueelle samalla häivyttäen pois epäolennainen informaatio. Eri leiketasoilta otettuja kuvia voidaan yhdistää ja näin saadaan aikaan kolmiulotteinen mallinnos tutkittavasta kohteesta. 2-fotonimikroskopiassa on mahdollista kuvata elävää kudosta sitä vahingoittamatta käyttäen hyväksi fluoresenssia. Nämä tekniikan eivät sovellu kirkastetuille kudoksille, vaan kuvantamisessa käytetään valotasomikroskooppia.

4.2 Valotasomikroskooppi

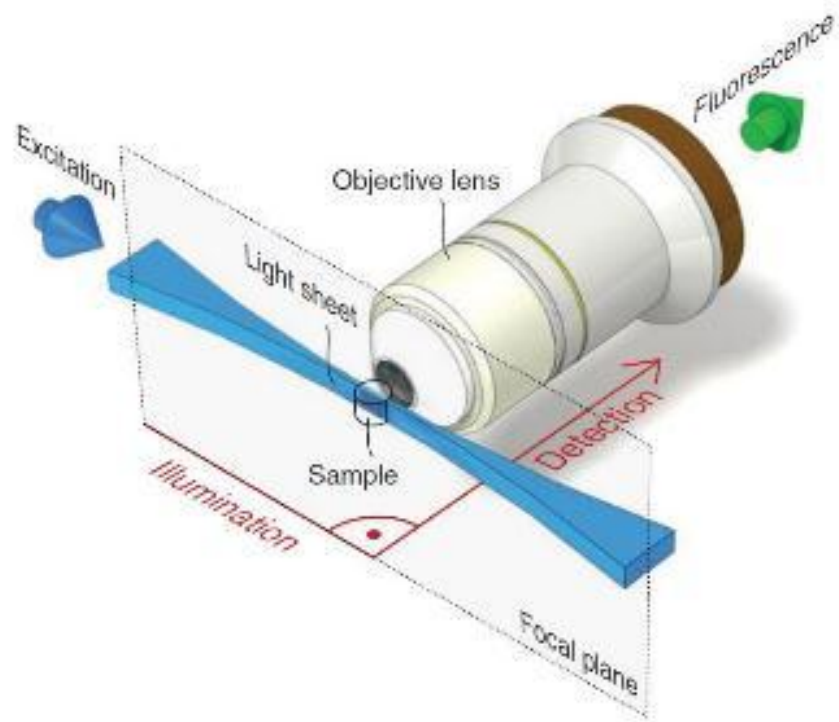
Valotasomikroskoopin toimintaperiaate perustuu ohueen valokaistaleeseen, jonka avulla kuvannettavasta, fluoroforeilla leimatusta läpinäkyvästä näytteestä saadaan optisia leikkeitä. Kappaletta liikuttamalla saadaan leikkeitä otettua eri kohdasta näytettä ja leikkeet voidaan yhdistää, jotta saadaan kolmiulotteinen digitaalinen kuva. Valotasomikroskopian etuja perinteiseen fluoresenssimikroskopiaan ovat korkea resoluutio, kuvantamisnopeus sekä noninvasiivinen kuvantaminen, jolloin näyte ei tuhoudu kuvannettaessa. Lisäksi valokaistaleen ollessa hyvin ohut näytteessä tapahtuu

fluoresenssin haalenemista, jossa kuvantamisessa käytetty valo heikentää näytteen fluoresenssia, mutta vain valaistussa tasossa (Santi 2011: 129-138).

Vaikka valotasomikroskopiaa on sovellettu monella eri tavalla, sen periaate on edelleen sama. Tutkittavaa näytettä eksitoidaan valitulla aallonpituudella olevalla lasersäteellä, jolloin näytteessä olevat fluoroforit emittoivat valoa tietyllä aallonpituudella. Näytteestä emittoituva valo kerätään perinteisellä objektiikalla sekä kuvausmenetelmällä kennolle, jolloin kuva saadaan digitaalisesti muodostettua (Huisken & Stainier 2009: 1963-1975).

Näytteen kiinnittäminen voidaan toteuttaa monilla tavoilla, riippuen käytettävästä mikroskoopista. LaVisionin Ultramicroscope -laitteistossa näyte asetetaan näytekammioon, joka täytetään samalla liuottimella tai puskurilla, jolla näyte on kirkastettu (LaVision Biotec 2015). Valotasomikroskoopin sovelluksessa SPIM:ssä näyte valetaan kääntyvään agarosigeeliin, joka on asetettu vedellä täytettyyn kammioon. Näin vältetään liuottimien käytöltä, sillä ne eivät ole yhteensopivia kaikkien mikroskooppien kanssa.

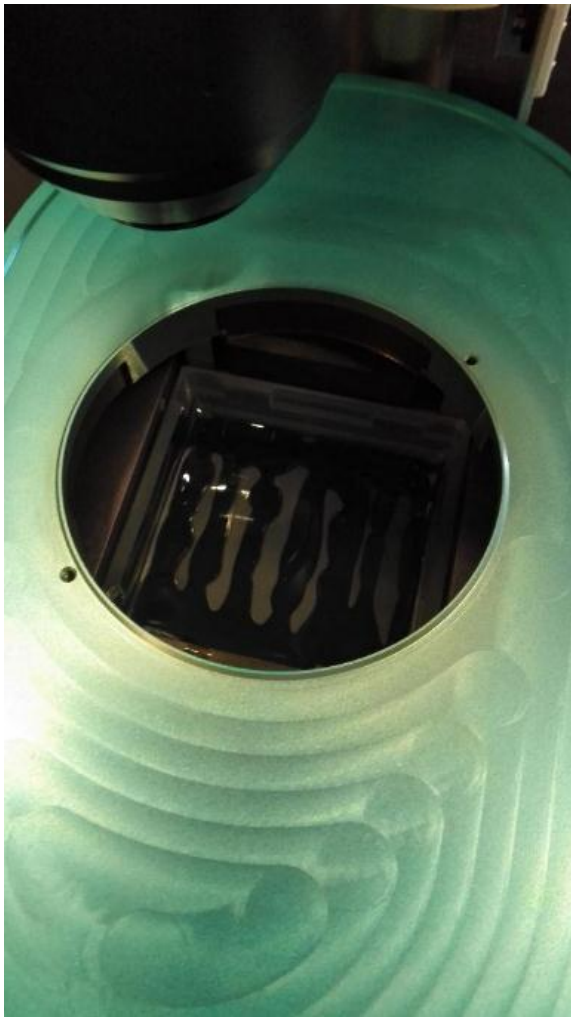
Kuvassa 5 havainnollisesta valotasomikroskoopin toimintaperiaatetta. Näyte asetetaan objektiivin eteen jalustalle, joka mahdollisesti voi olla liikkuva, jolloin koko kappale saadaan mallinnettua. Tämän jälkeen eksitaatiovalo kohdistetaan näytteeseen vaakasuoraan detektiosuuntaan nähden. Eksitaatiovalo on tietyn aallonpituuden laservaloa, jolloin valokaistaleesta saadaan mahdollisimman ohut sekä vain halutulla aallonpituudella oleva. Valokaistale saatetaan mikroskoopista riippuen ohjata näytteeseen vastakkaisilta puolilta tai useammastakin eri suunnasta. Tämän etuna on valon tasainen jakautuminen näytteeseen. Valokaistaleen kulkiessa näytteessä, valoteho heikkenee, mitä syvemmälle kudoksessa kuljetaan. Jos valokaistale ohjataan tulemaan näytteeseen kummaltakin puolelta, vältetään tummentumilta kuvassa, jotka saattaisivat heikentää tulosten tulkintaa. Tämä kuitenkin hidastaa kuvantamista, joka suurien näytteiden kohdalla on merkittävä asia.



Kuva 5. Valotasomikroskoopin toimintaperiaate[7.]

LaVision Biotecin Ultramicroscopessa valokaistale kulkee näytteeseen vastakkaisilta puolilta, mutta esimerkiksi saman valmistajan kehittyneemmässä Ultramicroscope II:ssa voi olla jopa kuusi valokaistaletta. Näin kuvasta saadaan tarkempi ja kirkaampi, mutta kuvantamisessa kestää moninkertaisesti kauemmin. Korkean resoluution sekä optisten leikkeiden määrän johdosta kuvatiedostoista tulee suuria (50–100 gigabittiä), joten kuvantaminen vie paljon aikaa. Tämän opinnäytetyön kokeellisessa osiossa käytettiin LaVisionin Ultramicroscopea, joka perustuu valotasomikroskopiaan.

Kuvassa 6 on Ultramicroscopen liuotinsäiliö, jonne alustalle kiinnitetty näyte asetetaan. Säiliö on täytetty dibentsyylietterillä, jotta näytteen sekä liuottimen taitekerroin ovat lähes samat.



Kuva 6. Liuotinsäiliö, johon näyte asetetaan.

LaVisionin mikroskoopi eroaa hieman tyypillisestä valotasomikroskoopista, koska siinä on kaksi valonlähdettä, jotka kohdistetaan näyttöihin vastakkaisilta puolilta, kuitenkin niin, että valokaistaleet kohtaavat näytteen vaakasuoraan detektioon nähden. Kahden vastakkaisen valonlähteen hyöty nähdään erityisesti suurissa näytteissä, kuten kokonaisissa aivoissa, joissa yhdestä suunnasta tulevan intensiteetti laskee huomattavasti edetessään kudoksessa.

Kuvassa 7 on taulukoituna Ultramicroscopen tekniset tiedot. Ultramicroscopessa oleva taitekerroinväli sijoittuu välille 1,33-1,56, joka soveltuu hyvin dibentsyylieetterillä kyllästettyyn ja siinä säilöttävään sekä kuvannettavaan näytteeseen (dibentsyylieetterin taitekerroin 1,561). Ultramicroscope soveltuu myös orgaanisissa liuottimissa säilöttyihin näytteisiin, toisin kuin esimerkiksi Zeissin Lightsheet Z.1:ssä, jossa orgaaninen liuotin vahingoittaisi mikroskoopin objektiivia (LaVision Biotec 2015).

Sheet optics	illumination	Uni- & bidirectional		
	Number of light sheets	3 – 6		
	Thickness	4 µm – 24 µm		
	Width	1 mm – 20 mm		
	Numerical aperture	0.0135 – 0.135		
	Focus positioning	Dynamic		
	Refractive index matching	1.33 – 1.56		
Zoom microscope for 2x objective lens	Zoom	Mono zoom		
	Zoom ratio	0.63x – 6.3x (1:10)		
	Objective lenses	2x	4x	20x
	Numerical aperture	0.5	0.3	0.35
	FOV diagonal (mm)	1.7 - 17.6	5.4	1.1
	Total magnification (objective lens + zoom ratio)	1.26x – 12.6x	(w/o Zoom)	(w/o Zoom)
	Working distance	4 mm, 6 mm, 10 mm	6 mm	2.5 mm
Detection optics	Refractive index matching	1.33 – 1.56		
	Chromatic detection	Eight filters		
	Chromatic correction	Dynamic 400 nm – 850 nm		
	Type	sCMOS		
	Pixel	2560 x 2160		
	Pixel size	6.5 µm x 6.5 µm		
	Maximum frame rate	100 fps @ full frame		
Imaging chamber	Read noise	1 e-		
	Imaging solution	aqueous buffers and organic solvents		
	Sample travel range (X, Y, Z)	1 cm, 1 cm, 1 cm		
	Sample size	µm Range to cm Range		
Light source	Laser module	Max. 5 Laser Lines , 50 mW - 100 mW per diode		
	Supercontinuum laser	Emission 460 nm – 800 nm, 1 mW/nm – 3 mW/nm		
Dimensions	54 cm x 70 cm x 65 cm (W x H x D)			
Weight	47 kg (w/o controller and laser)			

Kuva 7. LaVision Ultramicroscope II:n tekniset tiedot (LaVision Biotec: 2015)

LaVisionin Ultramicroscope on teoriassa hyvin yksinkertainen laite. Laser ohjataan filterin läpi, jolloin saadaan valittua valolle oikea aallonpituus. Peilien avulla laser ohjataan näytteeseen, joka on kiinnitetty liikkuvaan alustaan. Laservalo ohjataan näytteeseen vastakkaisilta puolilta, jolloin kuvannettaessa alusta liikkuu asteittain ja jokaisesta aivoalueesta saadaan tarkka kuva. Kuvauksessa rajoittavina tekijöinä ovat kuvattavan näytteen suuruus, vaadittavan eksitaatiolaserin aallonpituus, vaadittu liuotin sekä tarkkuus. Suuria näytteitä kuvannettaessa kuvauskammion sekä kiinitysalustan fyysinen koko asettavat rajoitukset näytteen enimmäiskoolle. Kuvassa 8 on numeroitu laitteiston tärkeimmät komponentit.



Kuva 8. LaVision Biotecin valotasomikroskooppi, jossa numeroituna tärkeimmät osat. Numero 1 on virtalähde, numero 2 on filterinvaihdin ja numerot 3–10 ovat peilejä, joilla laservalo saadaan ohjattua näytteeseen.

LaVisionin Ultramicroscope on teoriassa hyvin yksinkertainen laite. Laser ohjataan filterin läpi, jolloin saadaan valittua valolle oikea aallonpituus. Peilien avulla laser ohjataan näytteeseen, joka on kiinnitetty liikkuvaan alustaan. Laservalo ohjataan

näytteeseen vastakkaisilta puolilta, jolloin kuvannettaessa alusta liikkuu asteittain ja jokaisesta aivoalueesta saadaan tarkka kuva. Kuvauksessa rajoittavina tekijöinä ovat kuvattavan näytteen suuruus, vaadittavan eksitaatiolaserin aallonpituus, vaadittu liuotin sekä tarkkuus. Suuria näytteitä kuvannettaessa kuvauskammion sekä kiinnitysalustan fyysinen koko asettavat rajoitukset näytteen enimmäiskoolle.

Mikroskoopin lisäksi tärkeää on myös käytössä olevan tietokoneen prosessointiteho, työmuistin määrä sekä kuvankäsittelyyn vaadittava graafinen suorituskyky. iDISCO-protokollan yhteydessä käytetty analyysityökalu ClearMap vaatii tietokoneelta 128 gigabittiä työmuistia, vähintään teratavun SSD-kovalevyn sekä vähintään kuusiytimisen prosessorin. On selvää, että normaalikäytössä olevalla kannettavalla tietokoneella työskentely ei tule kyseeseen.

5 Työn suoritus

5.1 Näytteet

Opinnäytetyön varsinaisia näytteitä varten perfusoiitiin hiiriä, jotka voitiin jakaa kolmeen eri luokkaan värjäyksen sekä annetun virusinjektion perusteella. Opinnäytetyötä varten hiiret 4, 5 sekä 6 oli injisoitu PPT-aivoalueelle AAV-hm3Dq-mCherry-viruksella ja viruksen annettiin vaikuttaa kaksi viikkoa, jotta tuloksista saatiin luotettavia. Hypoteesina oli nähdä fluoresoivia proteiineja PPT-aivoalueella sekä sieltä lähteviä projektioita muualla aivoissa. Muut näytteet ovat eri tutkimuksissa tarvittavia näytteitä, mutta ne käsiteltiin iDISCO-protokollaa noudattaen ja kuvannettiin. Hiiret perfusoiitiin, niiden aivot poistettiin kirurgisesti ja niille tehtiin iDISCO-protokollan mukainen vasta-aine- ja kirkastuskäsittely. Liitteenä 1 oleva työohje on käännetty ja mukautettu versio alkuperäisestä iDISCO-ohjeesta. Ohjeeseen on lisätty työskentelyä helpottavia merkintöjä inkubointiajoista sekä tarvittavista reagensseista.

Käsittelyyn kuului näytteiden esikäsittely, vasta-ainekäsittely sekä viimeiseksi näytteiden kirkastus mikroskopointia varten, joka suoritettiin Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen -insituutissa Saksan Bonnissa Head of Light Microscopy -yksikössä. Mikroskooppina oli LaVisionin Ultramicroscope, jolla pystyttiin parissa päivässä kuvantamaan kolme varsinaista näytettä sekä viisi optimointinäytettä. Kuljetusta ja säilytystä varten näytteet säilöttiin dibentsyylieetteriin, jossa näytteet myös kuvattiin.

Vertailua varten valmistettiin kryostaatilla perinteisiä aivoleikkeitä, jotka värjättiin vasta-aineilla. Näiden näytteiden tarkoitus ei ollut tutkia mitään tiettyä aivoaluetta, vaan saada vertailtua eri tekniikoilla kuvannettuja näytteitä.

Hypoteesina oli todentaa virusinjektoiden onnistuminen havaitsemalla fluoresenssia injektoiduilla aivoalueilla. Lisäksi opinnäytetyötä varten tärkeämpi aspekti oli tarkastella valotasomikroskoopin toimintaa ja tehdä vertailua kolmiulotteisten mallien ja kudosleikkeiden välillä. Tämän takia valmistettiin myös aivoleikkeitä AAV-hm3Dq-mCherry -viruksella injektoidujen hiirten aivoista, suoritettiin vasta-ainevärjäys ja kuvaus Zeissin Axio Imager -mikroskoopilla.

Tehdyissä vertailuleikkeissä käytettiin kahta primääristä sekä kahta sekundääristä vasta-ainetta. Vertailuleikkeinä käytettiin transgeenisia cre-hiiriä, lyhenteeltään Cm, ja saaduista leikkeistä valittiin edustavimmin kuvannetut.

Taulukko 2. Primääri- ja sekundäärivasta-aineet

Laimennos	Vasta-aine	Valmistaja
1:100	Goat anti-chAT Ab144P	Millipore
1:800	Rabbit anti-mCherry Ab167453	Alexa Fluor
Laimennos	Vasta-aine	Valmistaja
1:1000	Donkey anti-goat 488 A-11055	Thermo Fischer
1:1000	Donkey anti-rabbit 594 Ab 150076	Alexa Fluor

Näytteille suoritettiin vasta-ainekäsittely ja niitä inkuboitiin primäärisen vasta-aineen kanssa yön yli ja sekundärisessä valolta suojattuna kaksi tuntia. Tämän jälkeen näytteet kiinnitettiin aluslasille, peitettiin peitinlasille ja annettiin kuivua yön yli.

Näytteet kuvattiin osissa Zeissin Axio Imager -mikroskoopilla käyttäen 10-kertaista suurennosta. Jokainen näyte kuvattiin pienissä osissa ja kuvat koottiin yhdeksi yhtenäiseksi kuvaksi käyttäen Zeissin omaa ohjelmistoa.

Taulukossa 3 on taulukoitu sekä koodattu PPT-aivoalueelle injisoidut näytehiiret. Taulukosta käy ilmi käytetyt primääri- sekä sekundäärivasta-aineet sekä käytetyt laimennokset.

Taulukko 3. PPT-injisoidut näytehiiret

Järjestys	ID	Kohde	Tyyppi	Primäärinen vasta-aine	Sekundäärinen vasta-aine
3	4	iDISCO/th_gfp	th-egfp-positive	Aves GFP-1020 (1:1000)	Goat Anti-Chicken ab150172 (1:500)
7	5	iDISCO/th_gfp	th-egfp-positive	Aves GFP-1020 (1:1000)	Goat Anti-Chicken ab150172 (1:500)
8	6	iDISCO/th_gfp	th-egfp-positive	Aves GFP-1020 (1:1000)	Goat Anti-Chicken ab150172 (1:500)

Aluksi injisoitiin näytehiirien halutulle aivoalueelle virusta, joka tässä tapauksessa oli AAV-CamKIIa-hm3Dq-mCherry. Kyseisessä viruksessa on CamKIIa-promoottori, joka sitoutuu glutamatergisiin neuroneihin. Lisäksi virus koodaa mCherry-proteiinia, joka on fluoresoiva aallonpituudella 587–610 nanometriä. Virusta injisoitiin tutkittavien hiirten PPT sekä LDT -aivoalueille. Taulukosta puuttuville injisoimattomille wildtype-hiirille ei tehty erillistä viruskäsittelyä, koska tutkittava proteiini on luonnostaan hiirien aivokudoksessa. Injisoinnin jälkeen transgeenisten hiirien aivoissa olevan viruksen annettiin vaikuttaa kaksi viikkoa, jotta tulokset olisivat luotettavia. Tämän jälkeen hiiret perfusoidiin ja niiden aivot säilöttiin PFA:han jatkokäsittelyä varten.

Perfusoidut aivot pestiin PBS-puskurilla, kuivattiin metanolisarjalla, valkaistiin vetyperoksidilla sekä pestiin useaan kertaan PBS/0,2% TritonX-100-pesuliuksella. Tämän jälkeen suoritettiin primäärinen- sekä sekundäärinen vasta-ainevärjäys käyttäen ensin aasin seerumia ja sen jälkeen haluttua vasta-ainetta. Vasta-aineiden valintaan vaikuttaa niiden metanolikestävyys johtuen useista metanolikäsittelyistä, mutta protokolla piti sisällään myös vaihtoehtoisia metanolivapaita käsittelyitä. Aasin seerumin tarkoituksena oli lamauttaa kudoksessa olevia pintaproteiineja, jotta varsinaisen vasta-aineen sitoutuminen olisi spesifisempää. Vasta-ainevärjäyksiä välissä näytettä pestiin 1 % hepariiniliuksella, jonka tarkoituksena on sitoutua solun pinnassa oleviin glykoproteiineihin ja näin estäen niitä sitoutumasta vasta-aineeseen.

Kirkastus suoritettiin käyttämällä 99,9-prosenttista tetrahydrofuraania(THF) sekä 99-prosenttista dibentsyylieetteriä (DBE).

5.2 iDISCO:n näytekäsittelyn optimointi

Taulukossa 4 esitettyjen PPT-näytehiirien lisäksi iDISCO-käsittely suoritettiin joukolle wildtype-hiirien aivoille taulukon 5 mukaisesti. Näiden näytteiden tarkoituksena oli tutkia kirkastuskäsittelyn vaikutusta eri vasta-aineille ja samalla perehtyä tarkemmin iDISCO-käsittelyn optimointiin.

Taulukko 4. Optimointinäytteet

Järjestykset	ID	Kohde	Tyyppi	Primäärinen vasta-aine	Sekundäärinen vasta-aine
4	1	iDISCO/chAT	Wildtype	AB144P/Vacht(1:50/1:500)	Donkey Anti Goat 647 1:200
1	2	iDISCO/chAT	Wildtype	AB144P/Vacht	Donkey Anti Goat 647 1:200
2	3	iDISCO/chAT	Wildtype	AB144P/Vacht	Donkey Anti Goat 647 1:200
5	7	iDISCO/surg DG-Gi	Wildtype	Rockland Anti-RFP (1:1000)	Anti-Rabbit Ab150172 (1:500)
6	8	iDISCO/surg DG-Gi	Wildtype	Rockland Anti-RFP (1:1000)	Anti-Rabbit Ab150172 (1:500)

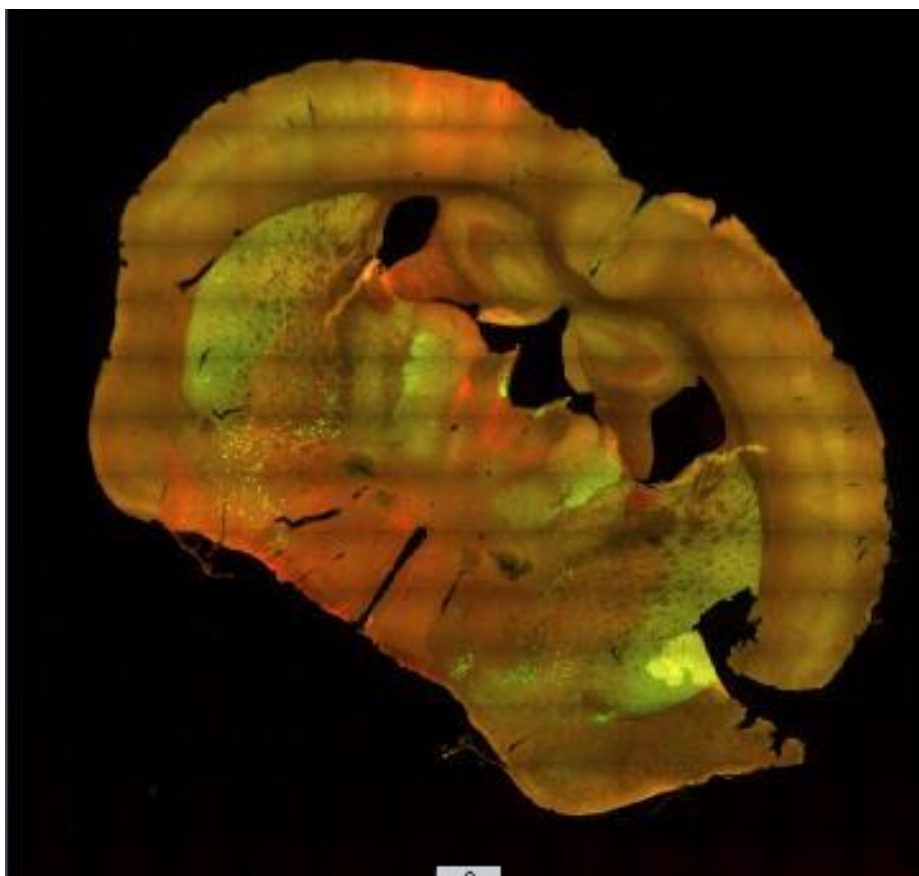
Optimointinäytteitä tehtäessä huomattiin, että iDISCO-käsittelyä oli mahdollista suorittaa useille eri näytteille samanaikaisesti. Vasta-aineista riippumatta reagenssit olivat kaikille samat, joten järjestelmällisyydellä sekä hyvällä aikatauluttamisella viiden näytteen valmistaminen ei tuottanut ongelmia. Leikkeitä valmistettaessa iso osa työajasta meni leikkeiden käsittelyyn, mutta iDISCO:ssa näytteet saivat inkuboitua koskemattomina, jolloin työpanosta oli mahdollista siirtää muihin kohteisiin. Lisäksi valitut vasta-aineet

olivat yhteensopivia tarvittavien reagenssien kanssa, eikä fluoresoiva signaali heikentynyt merkittävästi.

6 Tulokset

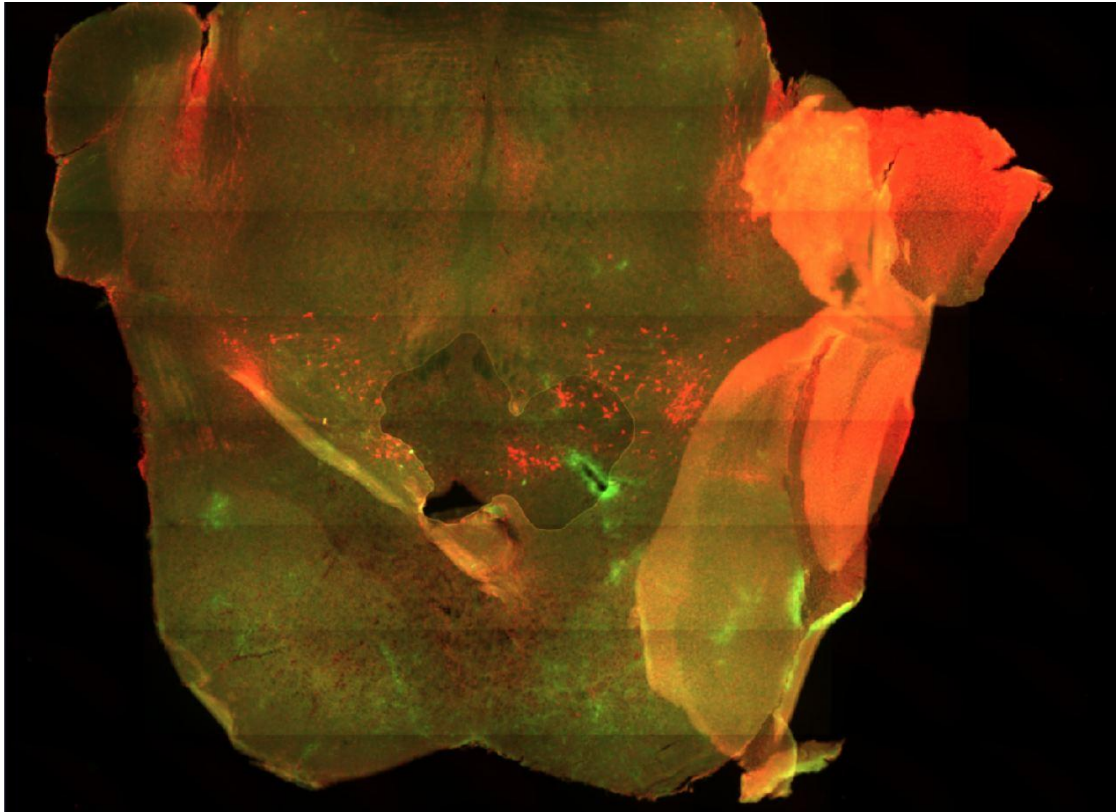
6.1.1 Leikkeet

Fluoresenssimikroskoopilla saadusta kuvasta 9 nähdään, että mCherry-värjättyjä punaisena näkyviä glutamatergisia soluja löytyy lähinnä aivon oikealta puolelta. Tämä on odotettavaa, koska kyseiselle eläimelle virusinjektio annettiin ainoastaan aivojen oikealle hemisfäärille. Koliinitransferaasisoluja sen sijaan löytyy kaikkialta aivoista, joten värjättyinäkin niitä tulisi löytyä vihreinä pisteinä monelta eri aivoalueelta. Kyseiselle leikkeelle tehtyä vasta-ainevärjäystä ei tehty samoilla vasta-aineilla kuin tutkimuksessa tarvittavat näytteet. Niiden mekanismi on kuitenkin samanlainen, jolloin pystyttiin todentamaan virusinjektion onnistuminen ja havainnollistamaan kudisleikkeiden antamaa kuvaa näytteestä.



Kuva 9. chAT- ja mCherry-vasta-aineilla värjätty aivoleike 10-kertaisella suurennoksella. chAT-solut(koliinitransferaasi) näkyvät vihreinä ja mCherryllä värjätty glutamatergiset solut punaisina. Näyte Cm194.

Kuvassa 10 voidaan havaita myös mCherry-värjättyjä glutamatergisia soluja, mutta kuvasta käy myös ilmi leikkeiden laatu. Leikkeiden kiinnitys aluslasille on haastavaa ja tilanteessa, jossa jokin aivoalue taittuu toisen päälle, tuloksia on vaikea tulkita. Tämä on nähtävissä kuvan oikeassa laidassa, jossa punaisena hohtava alue on päällekkäin taittunutta kudosta.



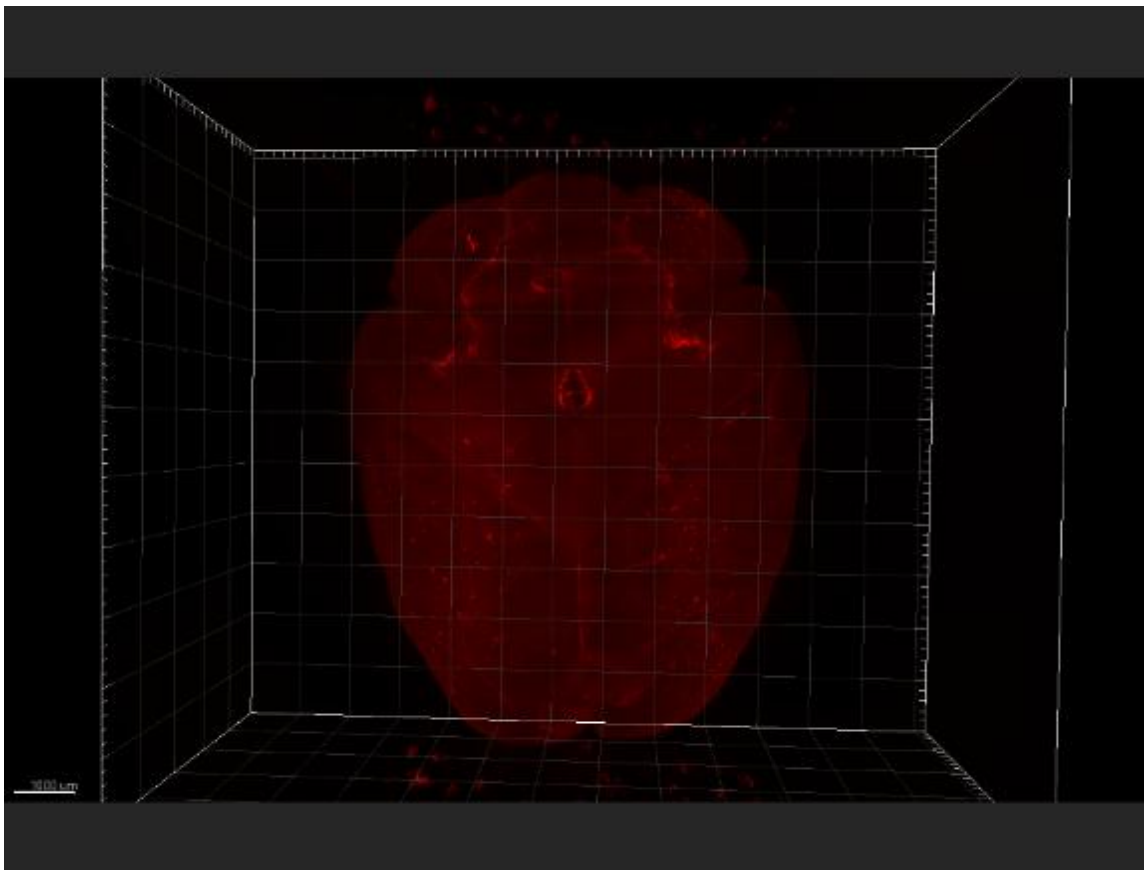
Kuva 10. Näytehiiri Cm194, jossa aivoalue on taittunut toisen päälle.

Saaduista kuvista nähdään, että virusinjektio on onnistunut ja tutkittavat solut voidaan havaita. Kuvannetuista näytteistä olisi mahdollista laskea tietokoneavusteisesti värjäytyneet solut ja näyttemäärän kasvaessa laskea virusinjektio tehokkuus.

6.1.2 Kirkastetut aivot

iDISCO soveltuu hyvin aivojen kuvantamiseen, koska tetrahydrofuraanilla pystytään kirkastamaan myeliinikudosta ja kirkastaminen voidaan suorittaa suhteellisen suurille kudoksenäytteille, halkaisijaltaan 1,5–2 senttimetriä. Heikkoutena iDISCO-menetelmässä on kudoksen kutistuminen sekä fluoresenssin katoaminen. Tetrahydrofuraanilla on ominaisuutena kudoksen kutistaminen, vaikka kudoksen sisäiset mittasuhteet pysyvätkin samana. Viimeisenä kirkastusliuottimena käytetty dibentsyylietteri tuhoaa ajan kanssa fluoresenssia, joten näyte tulisi kuvantaa hyvin pian kirkastamisen jälkeen. iDISCO:lla pystytään kirkastamaan ainoastaan perfusoituja ja paraformaldehydilla fiksattuja näytteitä, joten tämä asettaa tiettyjä rajoituksia näytteiden valinnalle. (Ertürk ym. 2012: 1983-1995)

Näytteet kuvattiin DZNE-instituutissa Saksan Bonnissa 17.–19.8.2016 ja saadut kuvat koottiin kolmiulotteiseksi malliksi Biomedicum Helsingissä käyttäen Imaris-ohjelmistoa. Saaduista kuvista tehtiin kolmiulotteiset animaatiomallit, jolloin kuvaustarkkuuden rajoissa pystyttiin liikkumaan kudoksen sisään sekä vaihtamaan näytteen tarkastelukulmaa. Kuvassa 11 on kuvattuna näyte 5 ylhäältäpäin projektiossa, jossa pikkuaivot sijaitsevat kuvan ylälaudassa. Näytettä eksitoitiin aallonpituudella 594 nm laserilla, jolloin aivoihin injisoitu fluorofori fluoresoi punaisena. Optimitilanteessa ainoastaan injisoidut solut näkyisivät punaisena, mutta aivokudoksen ominaisuutena on autofluoresenssi, joka näkyy punaisen aallonpituuden signaalina koko aivoissa.



Kuva 11. Kuvakaappaus Imaris-ohjelmalla rakennetusta mallista.

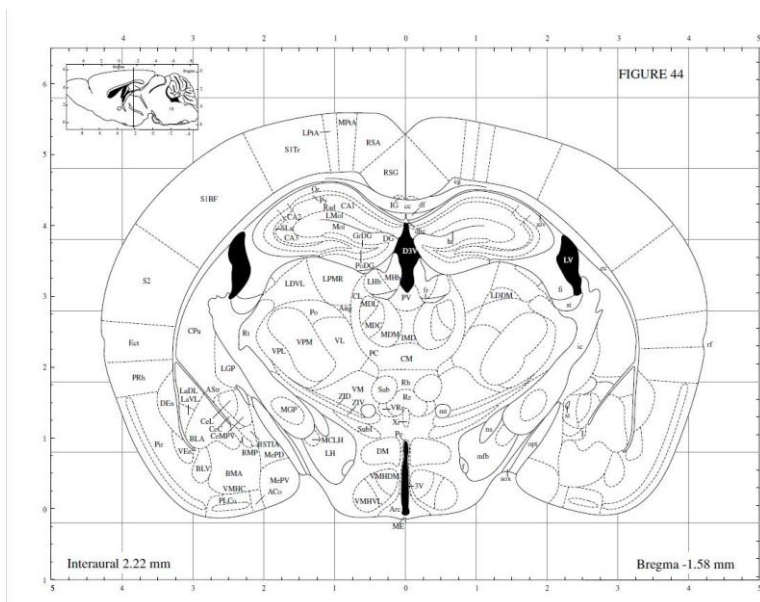
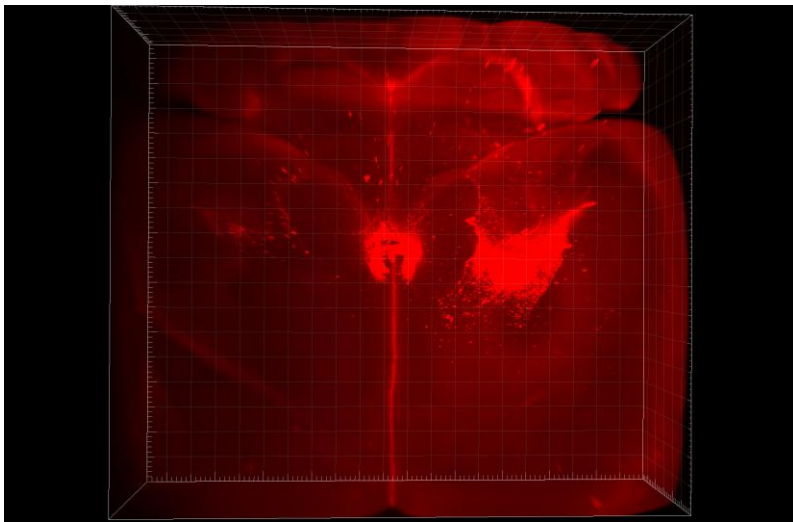
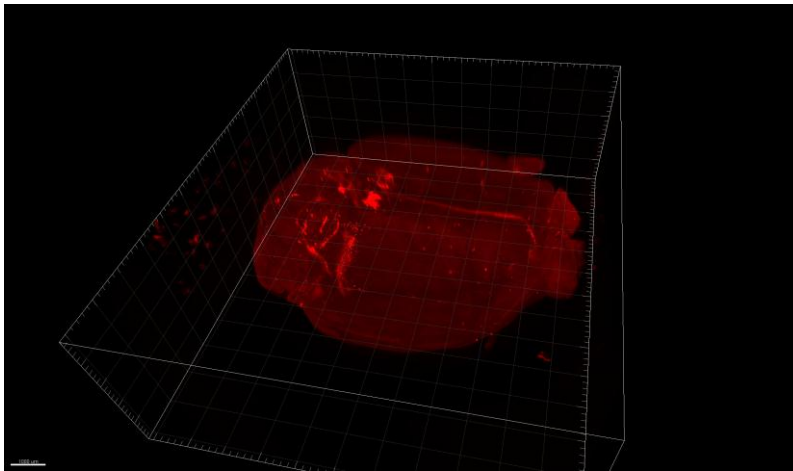
Malli rakennettiin noin tuhannesta yksittäisestä leikekuvasta, jotka koottiin yhdeksi yhtenäiseksi tutkittavaksi malliksi. Mallin resoluutiota sekä yleistä kuvantamistarkkuutta on mahdollista muokata ohjelman sisällä, mutta tarkkuuden kasvaessa mallin tiedostokoko kasvaa. Lisäksi mallin tutkiminen kolmiulotteisesti vaatii enemmän suorituskykyä tietokoneelta. Alla on kaksi Imaris-sovelluksesta saatua videota näytteestä 6. Videoista käy kuvia paremmin ilmi kuvannettujen näytteiden kolmiulotteisuus.

- [Video 1 \(https://www.youtube.com/watch?v=zqbgOIVOqeU\)](https://www.youtube.com/watch?v=zqbgOIVOqeU)
- [Video 2 \(https://www.youtube.com/watch?v=1gSNd7C1TTM\)](https://www.youtube.com/watch?v=1gSNd7C1TTM)

Vaikka kuvanlaatu videoissa onkin heikentynyt johtuen suoratoistopalvelujen videonpakkauksesta, videosta 1 käy hyvin ilmi kolmiulotteisen projektion hyödyllisyys: PPT-aivoalueella tapahtunut proteiiniekspressio näkyy punaisena fluoresenssina. Lisäksi videossa 2 näyte on kuvannettu ainostaan injisoidun aivoalueen kohdalta, jolloin ekspressio näkyy vielä paremmin. Vihreänä hohtava alue on osittain aivojen omaa

autofluoresenssia, mutta pistemäiset vihreät pisteet ovat koliinitransferaasisoluja, jotka on saatu värjättyä vasta-ainevärjäyksellä.

Kuvassa 12 on asetettu allekkain Imariksella rakennettu kolmiulotteinen malli, siitä eritelty leike sekä aivoatlaksesta saatu referenssikuva. Ylimmässä kuvassa on lintuperspektiivistä otettu kuva koko aivoista. Keskimmaisessä kuvassa on tehty mallinnos pelkästään tutkittavasta PPT/LDT-aivoalueesta, joka näkyy ylimmässä kuvassa kirkkaanpunaisena. Alin kuva on ote aivoatlaksesta, jolla pystytään paikantamaan kuvannetun aivon aivoalueet. Kuvasta käy ilmi myös vasta-ainevärjäyksen onnistuminen, mutta erityisesti jos tavoitteena on tutkia tiettyä aivoaluetta ja saada esimerkiksi laskettua siellä olevat solut, kudospelke on paras vaihtoehto. Tilanteessa, jossa yksikään tietty aivoalue ei ole tutkittavana vaan halutaan saada kokonaiskuva esimerkiksi fluoresoivien proteiinien sijainnista tai hermoratojen tarkasta rakenteesta, kokonaiskuvaus on paras vaihtoehto.



Kuva 12. Näyte 6 eri projektiosta.

7 Yhteenveto

Kudosleikkeisiin verrattuna kokonaisen aivokudoksen kuvantaminen vaatii tietoteknistä osaamista, perehtymistä valotasomikroskopointiin sekä käsitystä eri kirkastuskäsittelyiden vaikutuksesta fluoresenssisignaalin säilymisessä. Eri kirkastusprotokollilla on omat etunsa ja haittansa, mutta tähän opinnäytetyöhön valittu iDISCO on yksinkertaisin sekä vähiten erityislaitteistoa vaativa. Näytteisiin valitut vasta-aineet olivat sopivia, eikä iDISCO-käsittely merkittävästi heikentänyt niiden signaalia. Kudoksen kutistumisesta ei aiheutunut merkittävää haittaa, sillä kudoksen sisäiset mittasuhteet pysyivät samanlaisina eikä se vääristänyt kuvia. Koska tutkittavana kohteena ei ollut mikään tietty aivoalue tai siihen liittyvä projektiio, näytteitä tutkimalla saatiin hyvä käsitys tekniikan soveltuvuudesta tutkimukseen.

Opinnäytetyöhöni valittu kirkastustekniikka iDISCO toimi hyvin. Tilanteessa, jossa käytettävä mikrokooppi ei ole yhteensopiva dibentsyylieetterin tai muiden orgaanisten liuottimien kanssa, on valittava erilaiset kirkastustekniikat kuten CLARITY tai ScaleS. Näiden tekniikoiden etuna on myös reagenssien myrkyttömyys, joka helpottaa laboratoriotyöskentelyä huomattavasti.

Lisäksi vasta-ainevärjäyksessä tarvittavat vasta-ainemäärät ovat huomattavan suuria verrattuna perinteisiin kudosleikkeisiin. Kudosleikettä kohden tarvitaan mikrolitran murto-osa vasta-ainetta, kun taas kokonaisen aivokudoksen värjäykseen tarvitaan useita millilitroja. Tämä tulee huomioida tehdessä useampia värjäyksiä, koska vasta-aineet ovat huomattavan kalliita. Kaikesta huolimatta kokonaisen kudoksen kuvantamista on syytä tutkia enemmän. Kirkastustekniikoiden kehittyessä on mahdollista päästä tilanteeseen, jossa tutkittavan näytteen morfologia pysyy muuttumattomana koko kirkastuksen ajan ja kirkastukseen käytetty aika pienenee huomattavasti.

Lähteet

Azaripour, A. & Lagerweij, T. & Scharfbillig, C. & Jadczyk, A. & Willershausen, B. & Van Noorden C. A (2016): Survey of Clearing Techniques for 3D Imaging of Tissues with Special Reference to Connective Tissue, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*

Chung, K. & Deisseroth, K. (2013): CLARITY for Mapping the Nervous System, *Nature Methods* Vol 10. No 6. 508–513

Chung, K. et al. (2013): Structural and Molecular Interrogation of Intact Biological Systems, *Nature* 497, 332–337

Danbolt, N. Glutamate Uptake (2013): *Progress in Neurobiology* 65, 1–105

Daniels, R. & Gelfand, M. & Collins, C. & DiAntonio A. (2013): Visualizing Glutamatergic Cell Bodies and Synapses in *Drosophila* Larval and Adult CNS, *The Journal of Comparative Neurology*, 508, 131–152

Ertürk, A. & Becker, K. & Jährling, N. & Mauch, C. & Hojer, C. & Egen, J. & Hellal, F. & Bradke, F. & Sheng, M. & Dodt, H. (2012) Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO, *Nature Protocols*, Vol.7, No 11, 1983–1995

Gage, G.J., & Kipke, D.R., Shain, W. (2012): Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents, *Journal of Visualized Experiments*

Hama, H. et al (2011): Scale: a Chemical Approach for Fluorescence Imaging and Reconstruction of Transparent Mouse Brain. *Nature Neuroscience*, 14, 1481–1488

Hama, H. (2015): Sca/es: an Optical Clearing Palette for Biological Imaging, *Nature Neuroscience*, Volume 18, Number 10, 1518–1529

Huisken, J. & Stainier, D. (2009): Selective Plane Illumination Microscopy Techniques in Developmental Biology, *Development* 136, 1963–1975

LaVisionBiotec 2015. Ultramicroscope II Verkkodokumentti, luettu 1.6.2016

Mukherjee, S. & Manahan-Vaughan, D. (2013): Role of Metabotropic Glutamate Receptors in persistent Form of Hippocampal Plasticity and Learning, *Neuropharmacology* 66, 65–81

Prasad, V. & Semwogerere, D. & Weeks, E. (2007): Confocal Microscopy of Colloids, *Journal of Physics: Condensed Matter*, Volume 19, Number 11

Purves, D. & Augustine, G. & Fitzpatrick D. (2001): *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates

Renier, N. & Wu, Z. & Simon, D. & Yang, J. & Ariel, P. & Tessier-Lavigne, M. (2014): iDisco: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging, *Cell*, 159, 896–910

Richardson, D & Lichtman, J (2015): Clarifying Tissue Clearing, *Cell* 162, 246–257

Santi, Peter, (2011): Light Sheet Fluorescence Microscopy: A Review, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59, 129–138

Webb, R. (1995): Confocal Optical Microscopy, *Reports on Progress in Physics*, Volume 58, Number 3

Webb D. & Brown, C. (2012): Epi-Fluorescence Microscopy, *Methods in Molecular Biology*, Volume 931, 29–59

Marx, V. (2014): Microscopy: seeing through tissue. *Nat. Methods* 11 (12), 1209–1214,

iDISCO:n protokolla

iDISCO on tarkoitettu pienten biologisten näytteiden, kuten alkuiden tai elinten kirkastamiseen ja kolmiulotteiseen kuvantamiseen. Näytteitä on mahdollista leikata oikean kokoiseksi, riippuen käyttötarkoituksesta sekä laitteiston vaatimuksista. Tässä kyseisessä projektissa käytettiin hiiren aivoja.

Vasta-aineita valittaessa tulee ottaa huomioon vasta-aineen metanolikestävyys. Lista metanolia kestävästä vasta-aineista löytyy alkuperäisestä artikkelista tai sivulta <http://idisco.info/>. Näyte on myös mahdollista esikäsitellä ilman metanolia. Ohjeessa on ilmoitettu STOP-tekstillä pidemmät inkubaatiot, jolloin työ on mahdollista organisoida tehokkaasti.

Reagenssit

- PFA
- PBS
- Metanoli
- Vetyperoksidi
- Triton X-100
- Tween -20
- Donkey Serum
- Heparini
- DMSO
- Primäärinen sekä sekundäärinen vasta-aine
- Tetrahydrofuraani
- Dikloorimetaani
- Dibenzyl Ether

Näytteen keräys

1. Perfusoi hiiri paraformaldehydilla ja dissektoi aivot. Perfusoidut aivot säilötään 4 % PFA:han.

Näytteen puhdistus

1. Näytteet pestään 1x PBS:ssä 3 x 30 min
2. Pesun jälkeen näytteissä oleva vesi poistetaan metanolisarjalla:

20 %	3ml MeOH + 12ml PBS
40 %	6ml MeOH + 9ml PBS
60 %	9ml MeOH + 6ml PBS
80 %	12ml MeOH + 3ml PBS
100 %	15ml MeOH + 0ml PBS

Näytettä liotetaan jokaisessa laimennoksessa 30 minuutin ajan, jonka jälkeen näyte säilöttiin 100% metanoliin +4 °C:ssa.

3. Jäähdytä näyte jäällä; valkaise näytettä 5 % vetyperoksidilla metanolissa (1 osa 30 % vetyperoksidia, 5 osaa metanolia) o/n, +4 °C:ssa. **STOP**
4. Pese näyte 80 % metanolissa (80 % metanolia, 20 % 1x PBS:ää) 30 minuutin ajan huoneenlämmössä.
5. Valmistetaan PBS/0,2 % TritonX-100 pesuliuos
6. Näyte käsitellään metanolisarjalla (metanoli + PBS/0,2 % TritonX-100)

7.

80 %	12ml MeOH + 3ml PBS/Triton
60 %	9ml MeOH + 6ml PBS/Triton
40 %	6ml MeOH + 9ml PBS/Triton
20 %	3ml MeOH + 12 ml PBS/Triton
0 %	0ml MeOH + 15ml PBS/Triton

8. Näyte pestään vielä lopuksi 1x PBS/TritonX-100 -liuoksessa 2 x 1h ajan huoneenlämmössä.

Vasta-ainevärjäys

1. Esikäsiteltyä näytettä inkuboidaan 2–3 päivää 37 °C:ssa 1xPBS/0,2% Triton X-100/20 % DMSO/0,3M Glysiini-liuoksessa **STOP**
2. Näyte blokataan 1xPBS/0,2 % TritonX-100/10 % DMSO/6 % Donkey Serum -liuoksessa inkuboimalla 37 °C:ssa 4–6 päivää. **STOP**
3. Näyte pestään 1xPBS/0,2 % Tween-20/ 10µg/ml Heparin -liuoksessa (PTwH) huoneenlämmössä 2 x 1h ajan.
4. Inkuboidaan primäärisen vasta-aineen kanssa PTwH/5% DMSO /3% Donkey Serum -liuoksessa 37 °C:ssa 4–6 päivää. **STOP**
5. Näytettä pestään PTwH-liuoksessa 10 min, 15 min, 30 min, 1 h ja 2 h tai yön yli.
6. Inkuboidaan sekundaarisen vasta-aineen kanssa PTwH/3% Donkey Serum, 37 °C:ssa 4–6 päivää. Sekundäärisen vasta-aineen konsentraatio tulisi olla hyvin lähellä primäärisen vasta-aineen konsentraatiota. **STOP**
7. Näytettä pestään PTwH-liuoksessa 10 min, 15 min, 30 min 1 h ja 2 h tai enintään 2 päivää. **STOP**

Kirkastus

1. Inkuboidaan näytettä 50 % THF/H₂O-liuoksessa yön yli. Jokaisessa vaiheessa tulee käyttää suljettavaa lasista putkea. Lisäksi, liuoksen kokonaistilavuuden tulisi olla 5-10ml, jotta näyte ei olisi kosketuksissa ilman kanssa. **STOP**
2. Inkuboidaan näytettä 80 % THF/H₂O-liuoksessa 1 h.
3. Inkuboidaan näytettä 100 % THF/H₂O-liuoksessa 2 x 1h.
4. Inkuboidaan dikloorimetaanissa, kunnes näyte laskeutuu astian pohjalle (5 min – 1 h max). Jos näytteen sisälle on jäänyt ilmakuplia, näyte ei välttämättä laskeudu pohjalle. Dikloorimetaani auttaa kirkastamaan näytettä, mutta saattaa kutistaa pehmeitä kudoksia, kuten aivoja.
5. Inkuboidaan dibentsyylieetterissä kunnes näyte on kirkas (20 min -2 h). Putki, jossa näyte on, tulisi täyttää mahdollisimman täyteen, jotta näyte ei hapettuisi. **STOP**