

Jelátvitel az idegrendszerben:

Másodlagos hírvivő rendszerek:

Feladatuk:

Elektromos jel továbbítása a sejtszervecskék felé.

Eredmény:

Posztszinaptikus receptorok kémiai módosítása (foszforilálás, csatorna permeabilitása megváltozik)

Posztszinaptikus receptorok száma megváltozik (receptor fehérje szintézise megindul)

Szinapszis mérete megváltozik (dendrittüske nő illetve út dendrittüske alakul ki)

Egyik univerzális másodlagos hírvivó anyag: Ca^{2+}

Citoplazma Ca^{2+} koncentrációjának növekedés különböző enzimeket aktivál: foszforiláció,

transzláció,

transzkripció beindul

Citoplazma Ca^{2+} koncentráció növekedés kiváltója:

Extracelluláris Ca^{2+} beáramlása:

sejtmembrán Ca^{2+} ioncsatornái kinyílnak: poszt-szinaptikus receptor permeábilis Ca^{2+} ionokra
membrán depolarizáció Ca^{2+} csatornákat nyit

Intracelluláris Ca^{2+} felszabadulás:

Sejtszervecskék (endoplazmatikus retikulum, mitokondriumok) Ca^{2+} -ot raktároznak és ez bizonyos ingerekre (Ca^{2+} , inozitol trifoszfát) felszabadul.

Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedés jellemzői:

- Szinaptikus potenciálváltozásokkal kapcsolatban lokálisan alakulnak ki egy-egy szinapszis környékén
- Ca^{2+} ionok nem diffundálnak messzire, távoli dendritágak posztzinaptikus Ca^{2+} jelei nem összegződnek
- Akciós potenciál által kialakított nagy depolarizáció a neuron jóval nagyobb részén vált ki intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedést
- Akciós potenciál által kiváltott Ca^{2+} növekedés összegződhet a szinapszis környékén kialakult Ca^{2+} növekedéssel
- Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedés mérhető Ca^{2+} ion érzékeny festékek alkalmazásával

Ca²⁺ érzékeny festékek

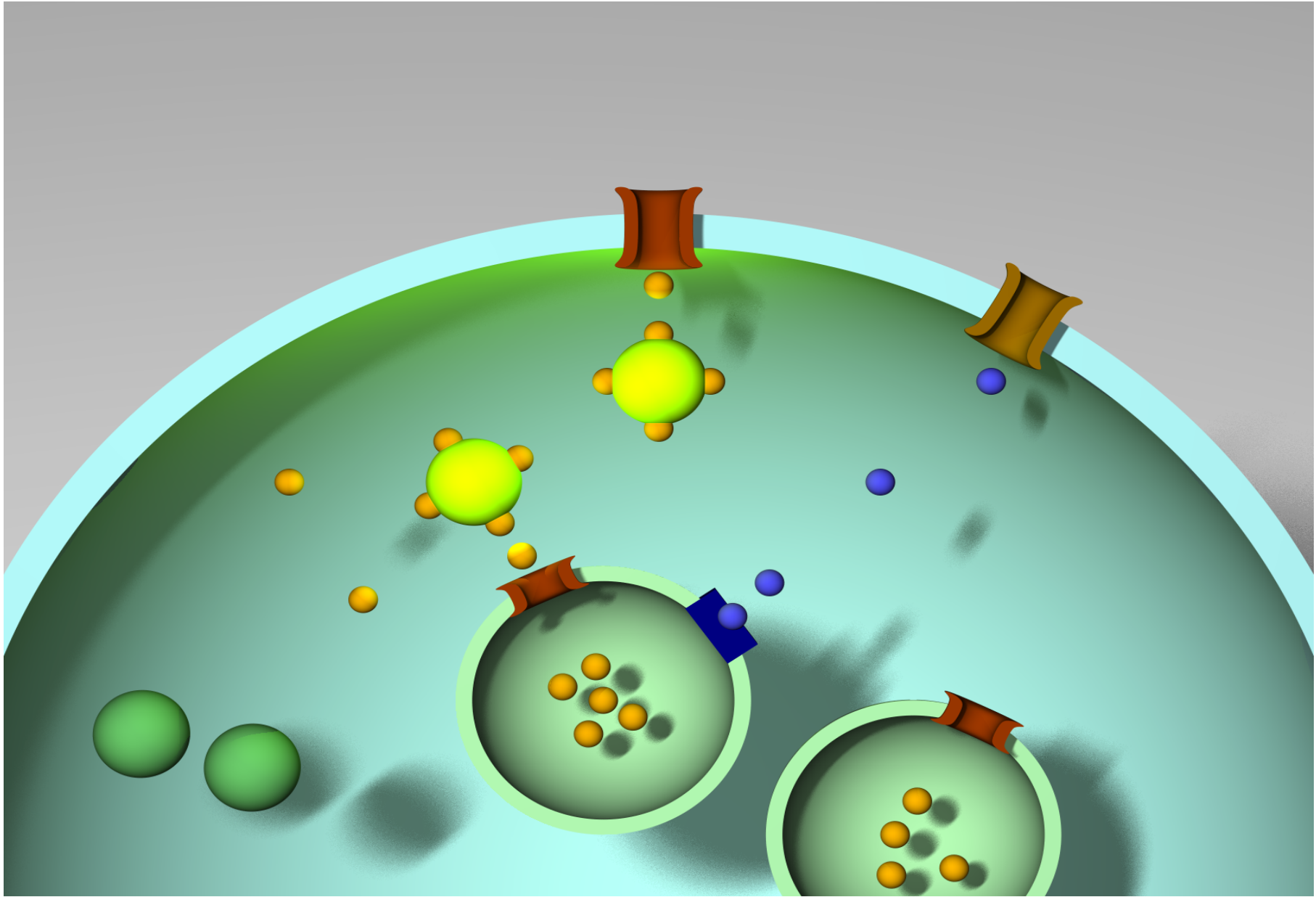
- Acetoxymetil-észter (AM) formában kerül forgalomba.
- AM-észter segít átjutni a membránon
- Intracellulárisan észteráz enzimek elbontják ezt a részt, nem tud kijönni.
- Alapállapotban a festék nem bocsát ki fényt.
- Ca²⁺-mal komplexet képez és fluoreszkál a megfelelő gerjesztő fény hatására.

Jellemzőik:

disszociációs konstans: milyen koncentrációnál köti meg a Ca²⁺-ot

gerjesztési spektrum: UV, látható fény

emissziós spektrum: zöld, kék, piros



Fluoreszcencia

A minta megvilágítása a fluorofór gerjesztési hullámhosszának megfelelő fénnel, majd detektálnunk kell a fluorofór által kibocsátott, magasabb hullámhosszú fluoreszcens fényt. A mintából azonban nem csak fluoreszcens fény, hanem szórt gerjesztő fény is ered, így ha csak az előbbit akarjuk érzékelni, az utóbbit ki kell szűrünk.

Ezt optikai szűrők és dikroikus tükrök segítségével oldják meg.

Optikai szűrők színtonkomponensek kiszűrésére alkalmasak, azáltal, hogy csak adott hullámhossztartományban engedik át a fényt, a többi hullámhosszt pedig elnyelik.

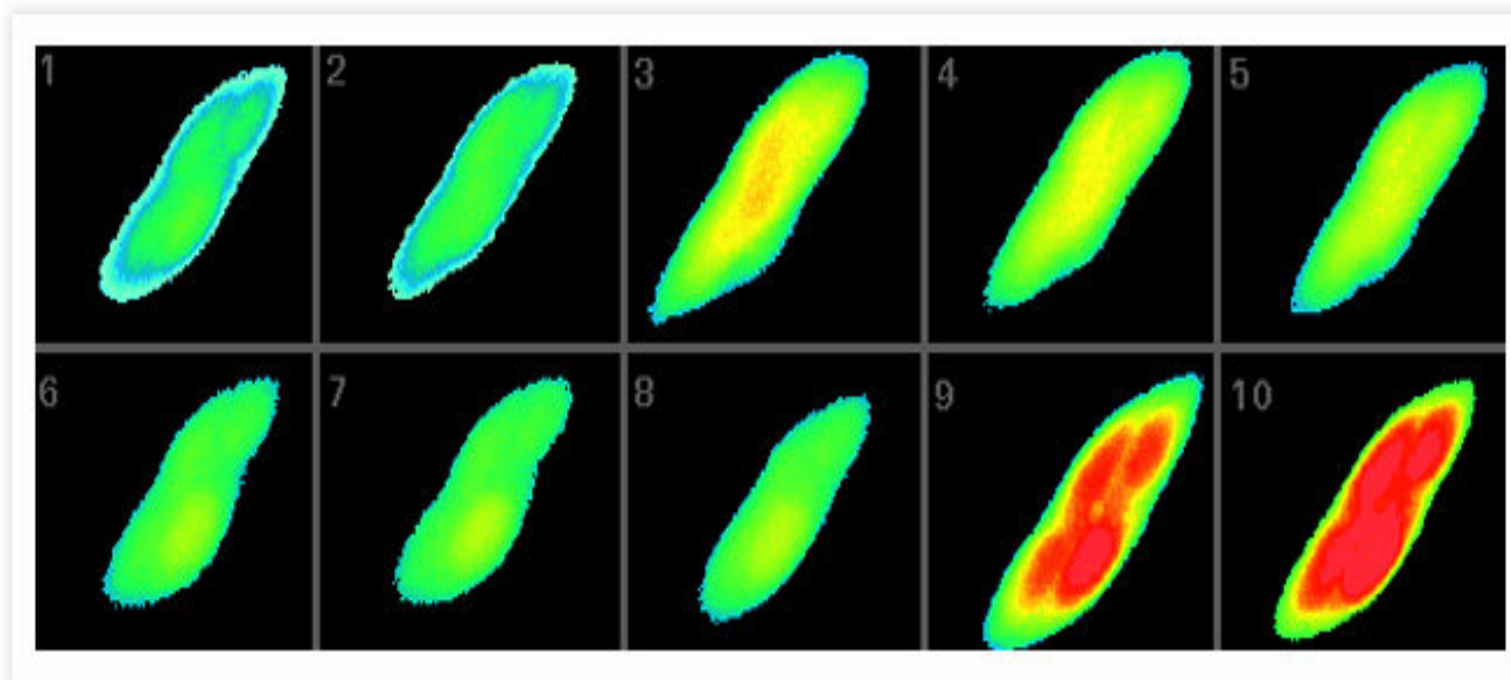
Dikroikus tükrök színtonkomponensek szétválasztását végzik el: visszavernek egy adott hullámhossztartományba eső fényt, a többit pedig átengedik.

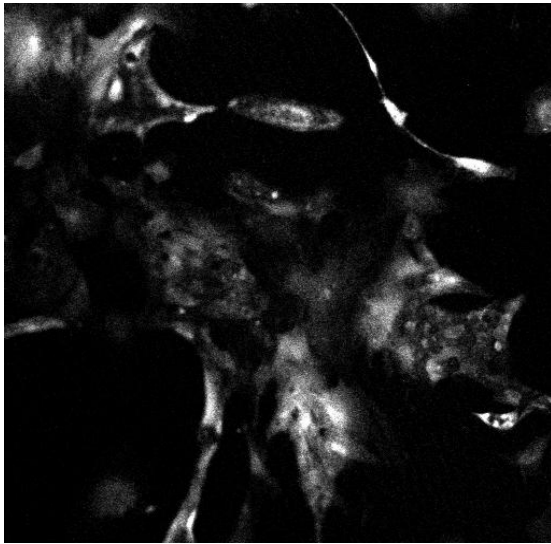
Intracelluláris Ca^{2+} szint változás az AtT-20/D16v-F2 sejtvonalba

1-2 kontroll

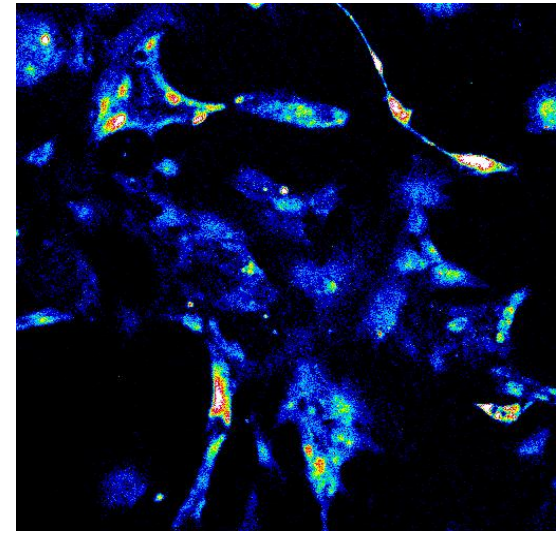
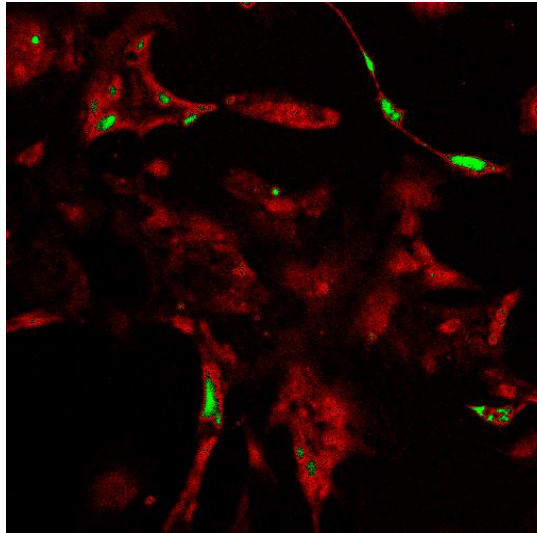
3 50mM KCl

9 5 μM ionomycin Ca^{2+} ionofor





Az eredeti regisztrálás fényességet rögzít

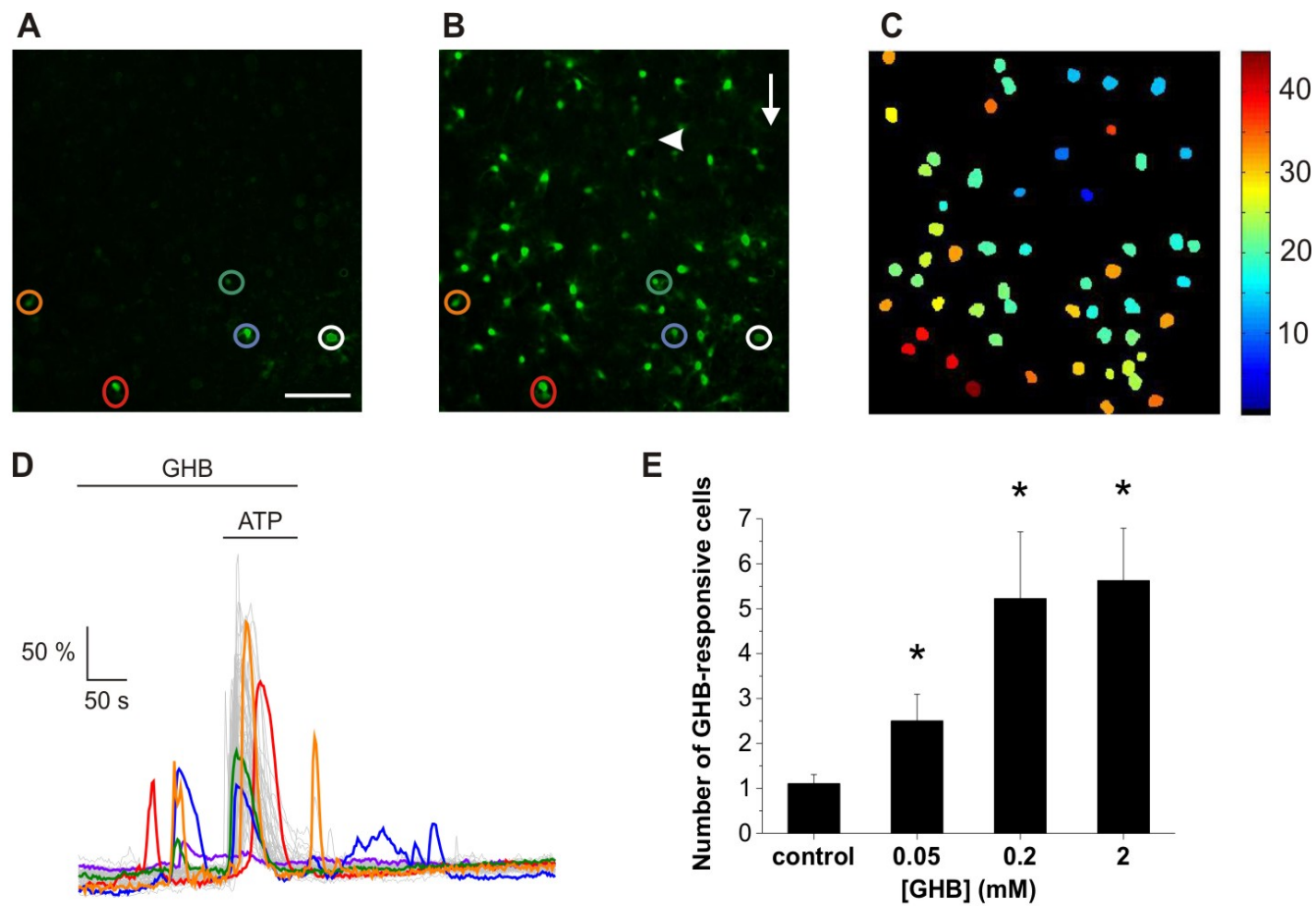


edges: mozgások detektálása

green-red: nagy változások kiemelése, kisebb változások elnyomása

16colors: 16 színű skála, átmenetek érzékelésére

GHB és ATP hatása az asztrociták intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjára.



Konfokális mikroszkópia

Fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas.

Jobb felbontású képeket ad, mint a hagyományos fluoreszcens mikroszkópok.

Képes "optikai szeletelésre", képet tud alkotni a minta egyetlen szeletéről.

A konfokális képalkotás lényege, hogy a rendszer csak a fókuszsíkból jövő fényt detektálja.

A kapott digitális kép számítógéppel kezelhető és elemezhető.

Több szelet képét összerakva a fluorofór térbeli elhelyezkedése vizsgálható.

Konfokális elv:

A hagyományos mikroszkópoknál a minta egy területét éri a megvilágítás, míg a konfokális mikroszkópnál egyszerre csak a minta egy pontját világítják meg.

A lézer fényforrás fényét az objektív lencse a minta egy pontjára fókuszálja, majd a mintából eredő fluoreszcens ill. visszavert fényt ugyancsak az objektív gyűjti össze.

A minta egy adott síkjából jövő fény az optikai rendszeren való áthaladás után egy adott fókuszpontban öszpontosul, majd a detektorba jut.

A fókuszpont körül egy kicsiny átmérőjű rést helyezünk el, úgy hogy nyílása éppen erre a fókuszpontra essen, így a fókuszsíkból jövő fény zavartalanul eléri a detektort, viszont a fókuszsíkon kívülről jövő fényt szinte teljesen kirekesztjük.

Mivel egyszerre csak a minta egyetlen pontját világítja meg lézer, ahhoz, hogy képet kapjunk, sorra végig kell pásztázzuk a vizsgálandó terület minden egyes pontját. Ezt pásztázó nyalábbal oldják meg. Az eltérített nyaláb sorra végigfut a terület minden pontján.

A detektor minden egyes pontban megméri a fény intenzitását, ezekből a számítógép összerakja a képet.

Konfokális mikroszkóp előnyei

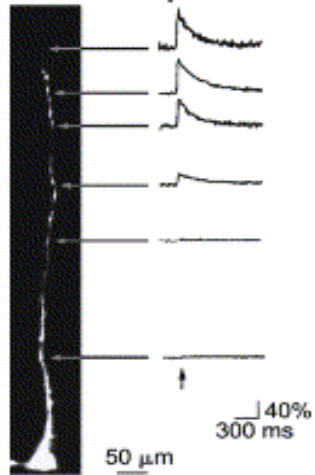
Jobb felbontású képek készíthetők 0.7x a felbontása

Képes kiszűrni a fókuszsíkon kívülről eredő fényt, így a képek kontrasztosabbak és kevésbé elmosódottak;

Az "optikai szeletelés" és a számítógépes adatfeldolgozás segítségével vastag minták 3-dimenziós struktúrái is feltérképezhetők.

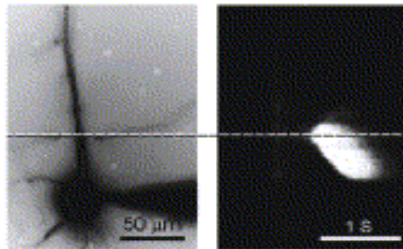
A mintából érkező fluoreszcens jel gyakran igen gyenge. Ha a pásztázó sugár több időt tölt el az egyes pontok felett, a rendszer több fényt gyűjt egy adott pontból. A pásztázás lassúbb lesz, egy kép felvétele hosszú időt vesz igénybe, viszont jobb minőségű lesz. A kép egésze így is rövidebb ideig lesz gerjesztve mint a hagyományos mikroszkópnál, kevésbé károsodik.

A Ca^{2+} action potential



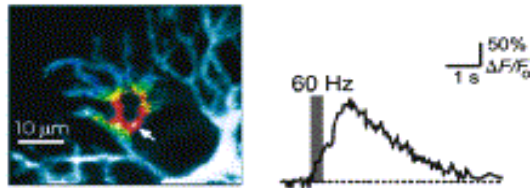
A: Akciós potenciál által kialakított intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés

B Ca^{2+} wave



C: Dendritikus Ca^{2+} szint növekedés: lokálisan egy szűk régióban következik be

C Regional Ca^{2+} signal



D Spine Ca^{2+} signal

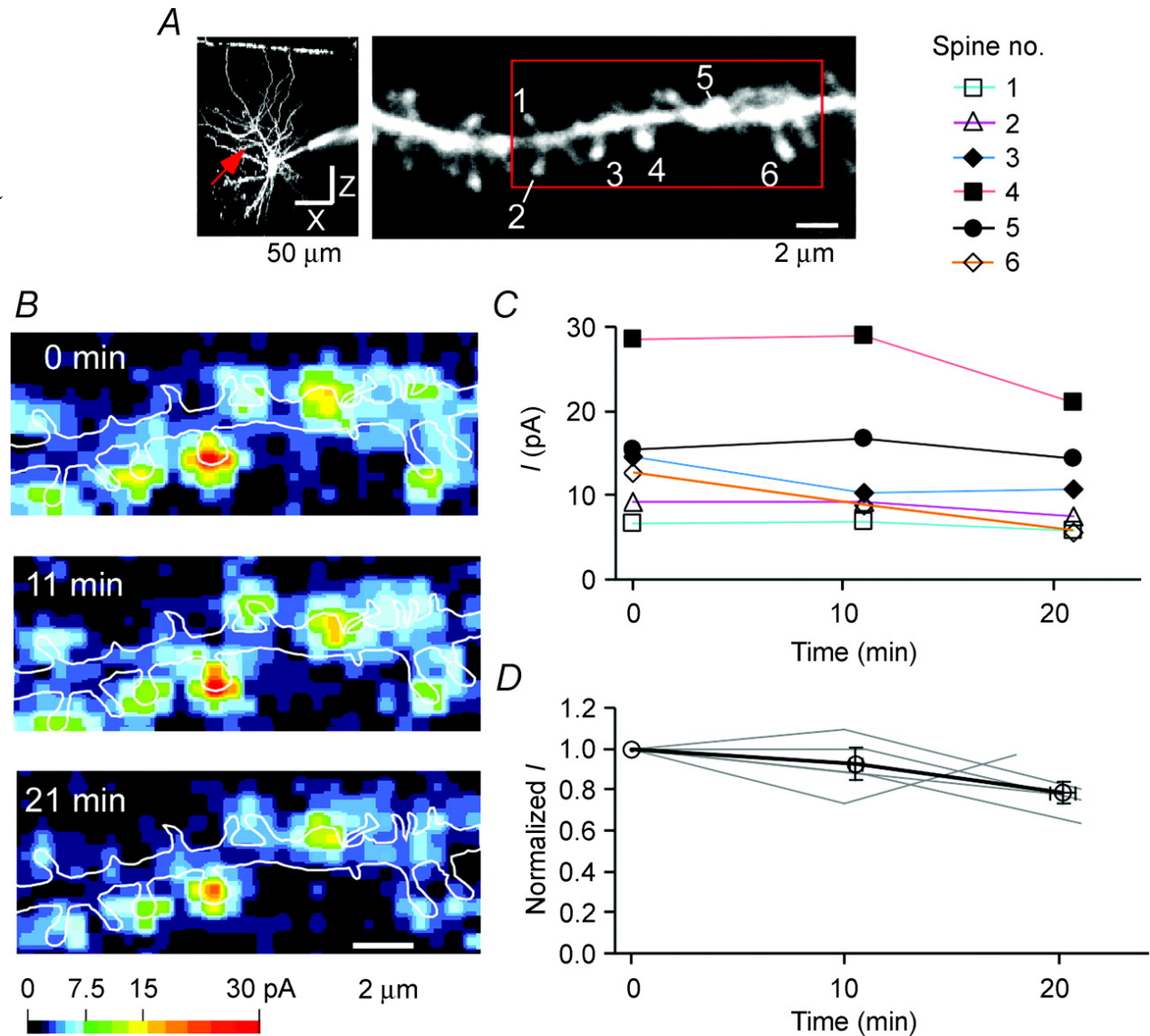


Piramissejtből whole cell voltage clamp elvezetés in vivo.

Piros nyíl és a piros keret mutatja a

B panelen lévő dendrit helyét a neuronban

Ingerlés glutaminsav felszabadítással



Feladat:

1. feladat

.lsm file kiválasztása

file nevének beírása a jegyzőkönyvbe

File kinyitása Fiji programmal

1-1 kép mentése 2 tetszőleges színskálával

Image Lookup Tables : tetszőleges beállítások kiválasztása

Save as jpg: új file név

2 kép beillesztése a jegyzőkönyvbe.

2. feladat

5-10 db olyan sejt kiválasztása amelyeknek a fluoreszcenciája időben változik

i) animáció lejátszása

ii) fluoreszcenciájukat változtató sejtek bekarikázása. A karikában lehetőleg 1 sejt legyen.

Analyze/Tools/ROI manager

add

save

1 kép mentése a karikákkal együtt

Analyze/Tools/ROI manager/Properties: karika vonalvastagságának állítása

more: Analyze/Tools/ROI manager/Options: more colors megfelelő szín kiválasztása

screenshot készítése

Ubuntu-ban: Applications/Accessories/Screenshot grab the current window

3. feladat

multimeasure: Result.xls

Result.xls kinyitása

1. oszlop és Mean oszlopok kellenek csak

időtengely szerkesztése

1 kép 1.8ms alatt készül el 1 oszlop minden értékét beszorozzuk 1.8-cal.

xy plot készítése

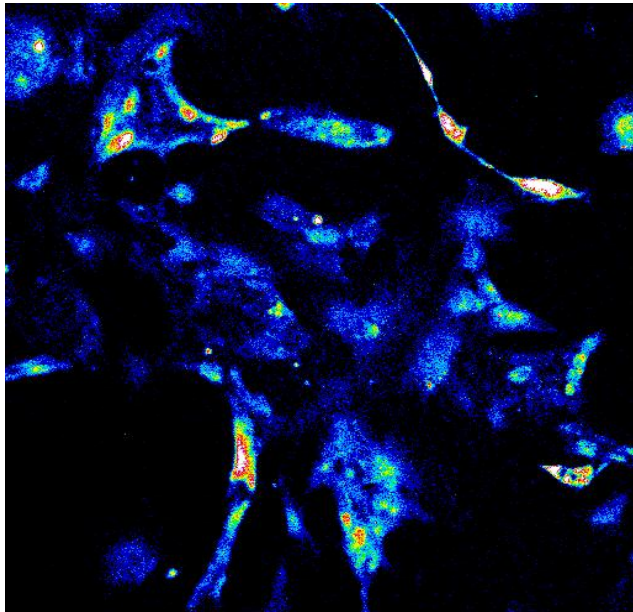
xy plot exportálása a jegyzőkönyvbe.

tengelyek feliratozása: x: idő y: fluoreszcencia

Kiválasztott file neve: contr-0413-3.lsm

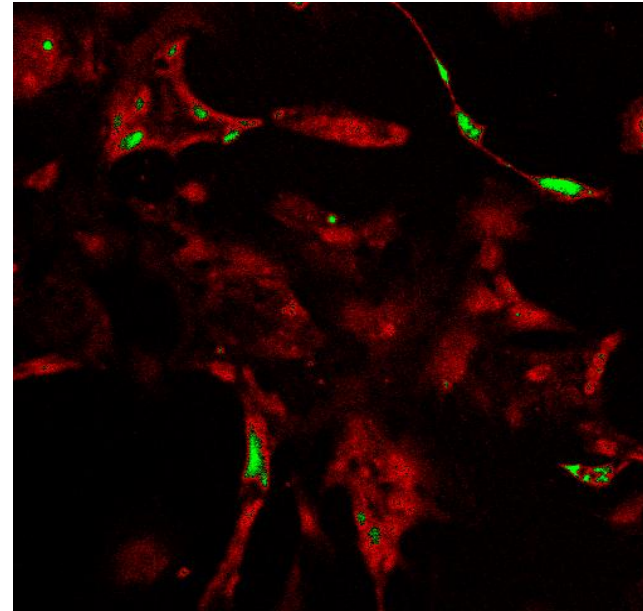
1. feladat:

egy megfelelő színskála kiválasztása:



16colors

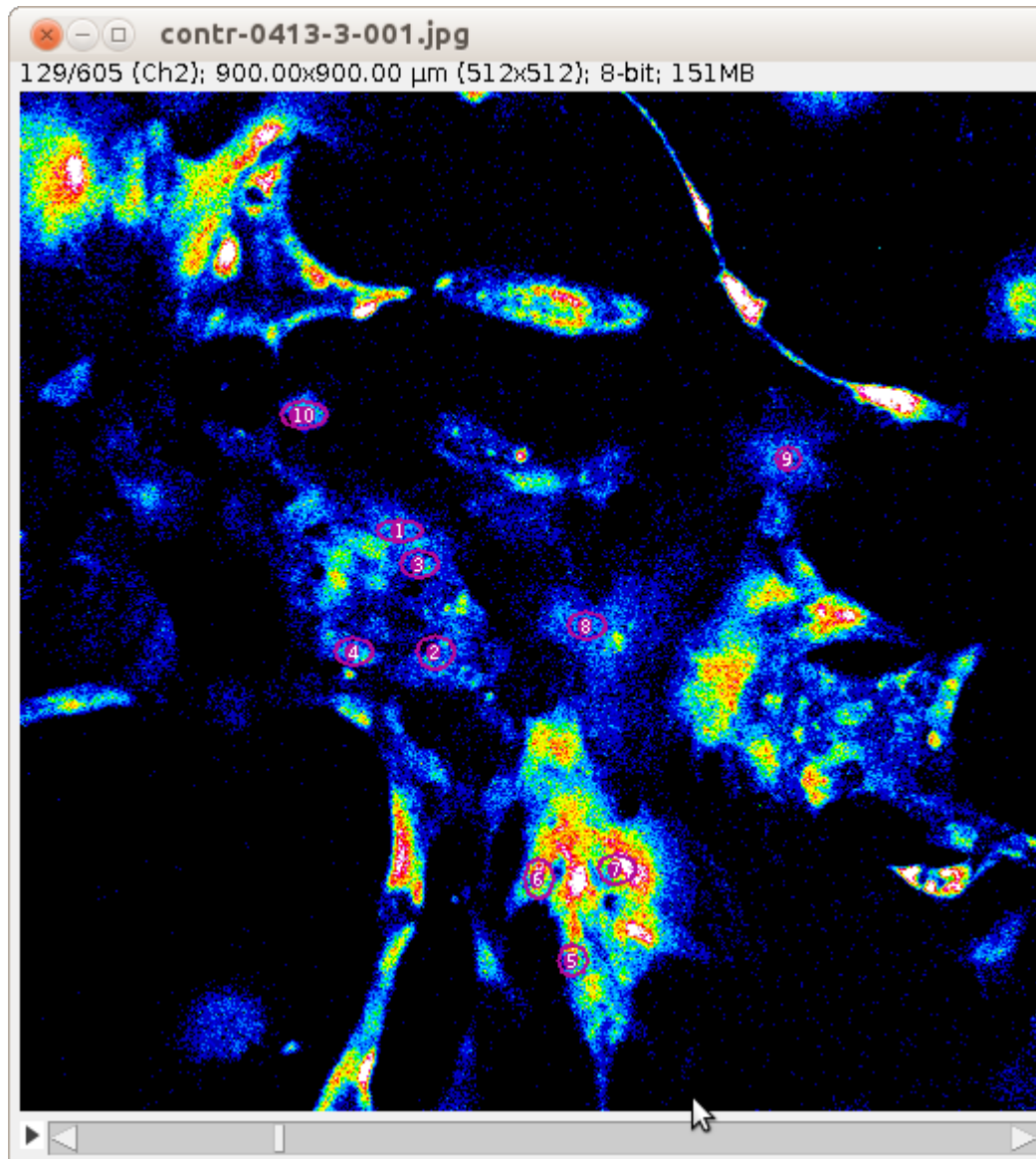
választott



redgreen

2. feladat

10 sejt kiválasztása:



3. feladat

Maximális 1089 sec

