

*Giulia Clementi*

---

Imaging e visualizzazione 3d di circuiti cerebrali del primate trattati con clarity

Corso di  
informatica biomedica

---

# Indice dei contenuti

---

- ❖ Introduzione: contesto, applicazioni e problematiche;
- ❖ Visualizzazione 3d: ViSUS & LAR framework;
- ❖ Tecniche istologiche;
- ❖ Risultati.

# Introduzione



---

# Contesto ed applicazioni

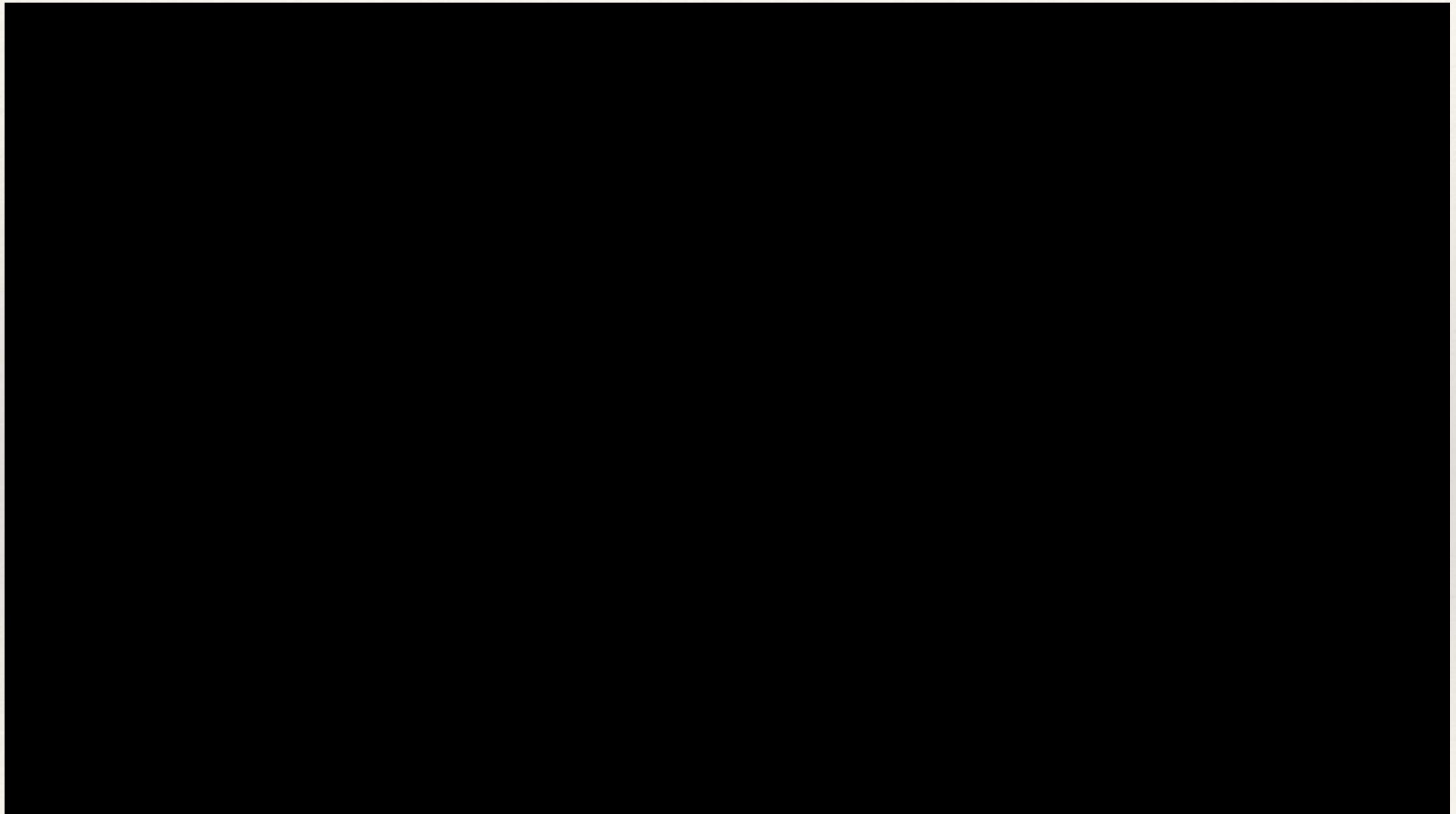
---

- ❖ Neuroscienze;
- ❖ Neuro-anatomia;
- ❖ Connettoma;
- ❖ Studio di patologie come autismo, schizofrenia, depressione, ansia;
- ❖ Ambliopia;
- ❖ Tracciamento automatico delle connessioni.

---

# Neurotracker - ViSUS

---



---

# Problematiche

---

- ❖ Grandi dimensioni e complessità del cervello del primate rispetto a quello del topo;
- ❖ Mole massiva di dati;
- ❖ Lunghi tempi di acquisizione;



---

# Esempio

---

- ❖ Corteccia visiva primaria (V1)
- ❖ Diametro del sito di iniezione: 1mm
- ❖ Assoni marcati: 60mm<sup>3</sup>
- ❖ Z-risoluzione: 1μm
- ❖ Imaging di un volume di 5mm<sup>3</sup>:
  - ❖ tempo: 96 ore
  - ❖ dati generati: 130GB
- ❖ Imaging di un volume di 60mm<sup>3</sup>:
  - ❖ tempo: 19 giorni
  - ❖ dati generati: 1.6TB

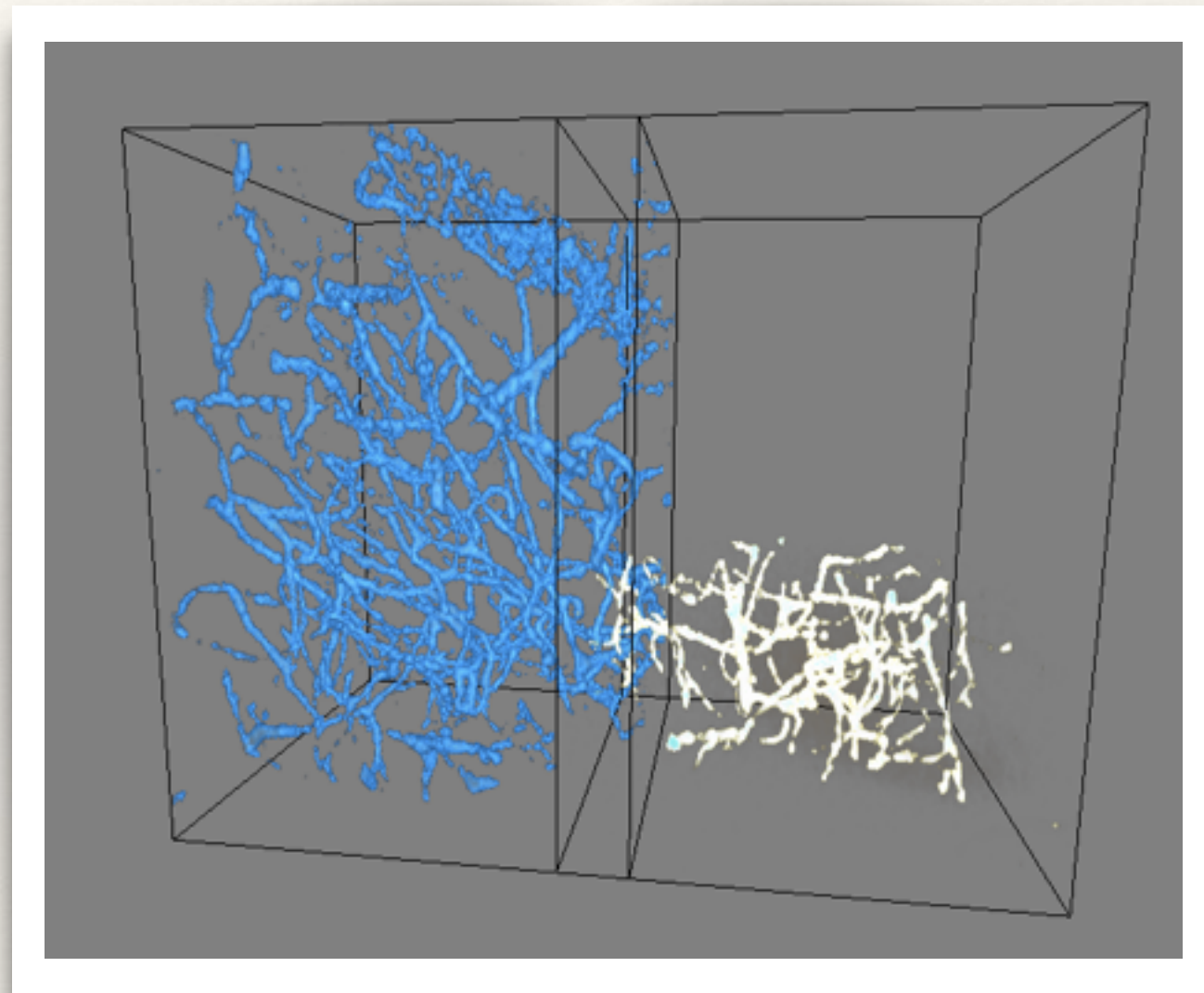


# Visualizzazione 3D

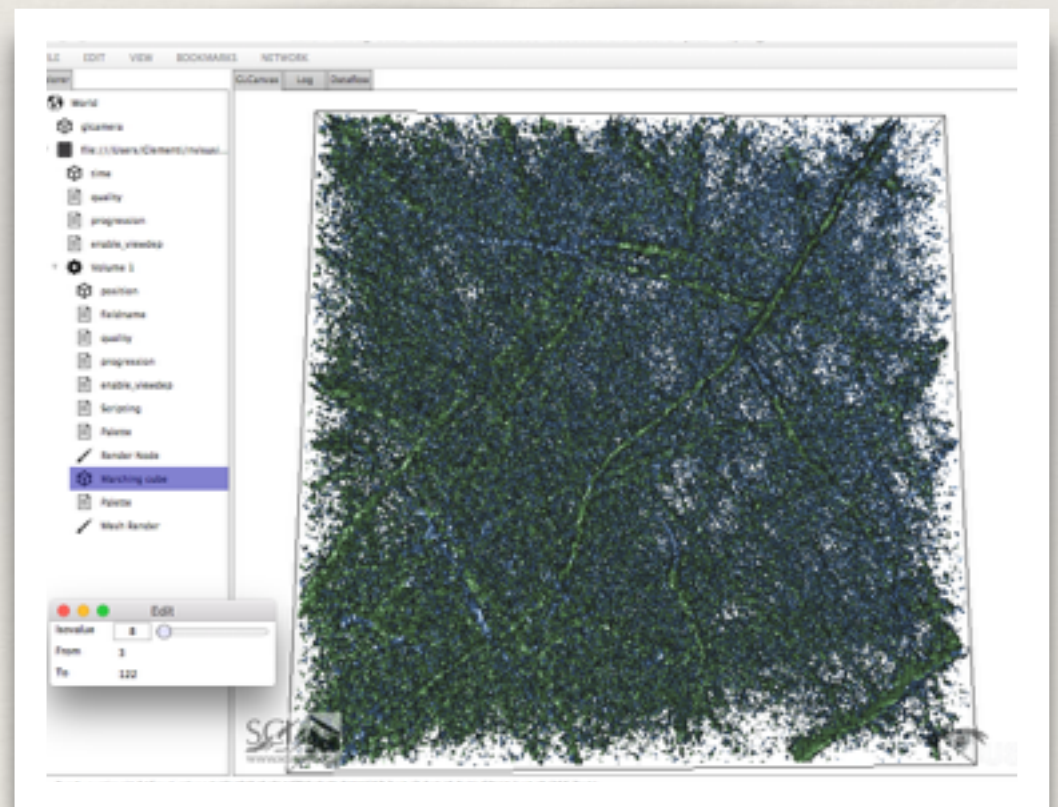
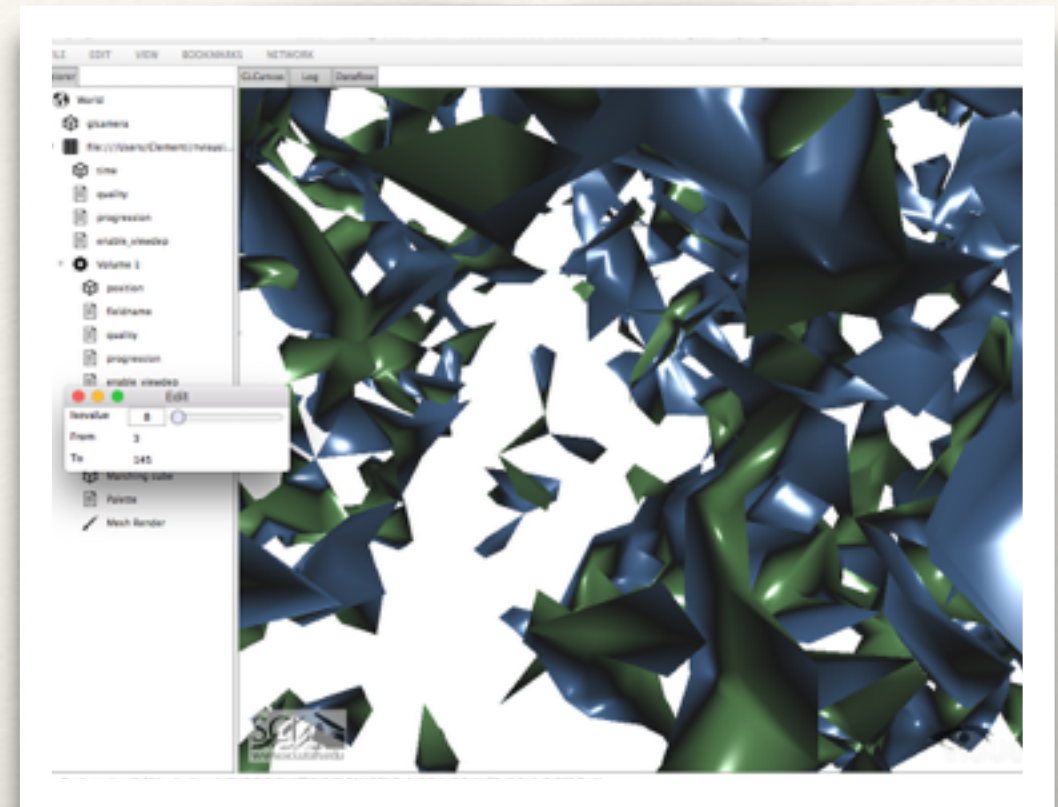
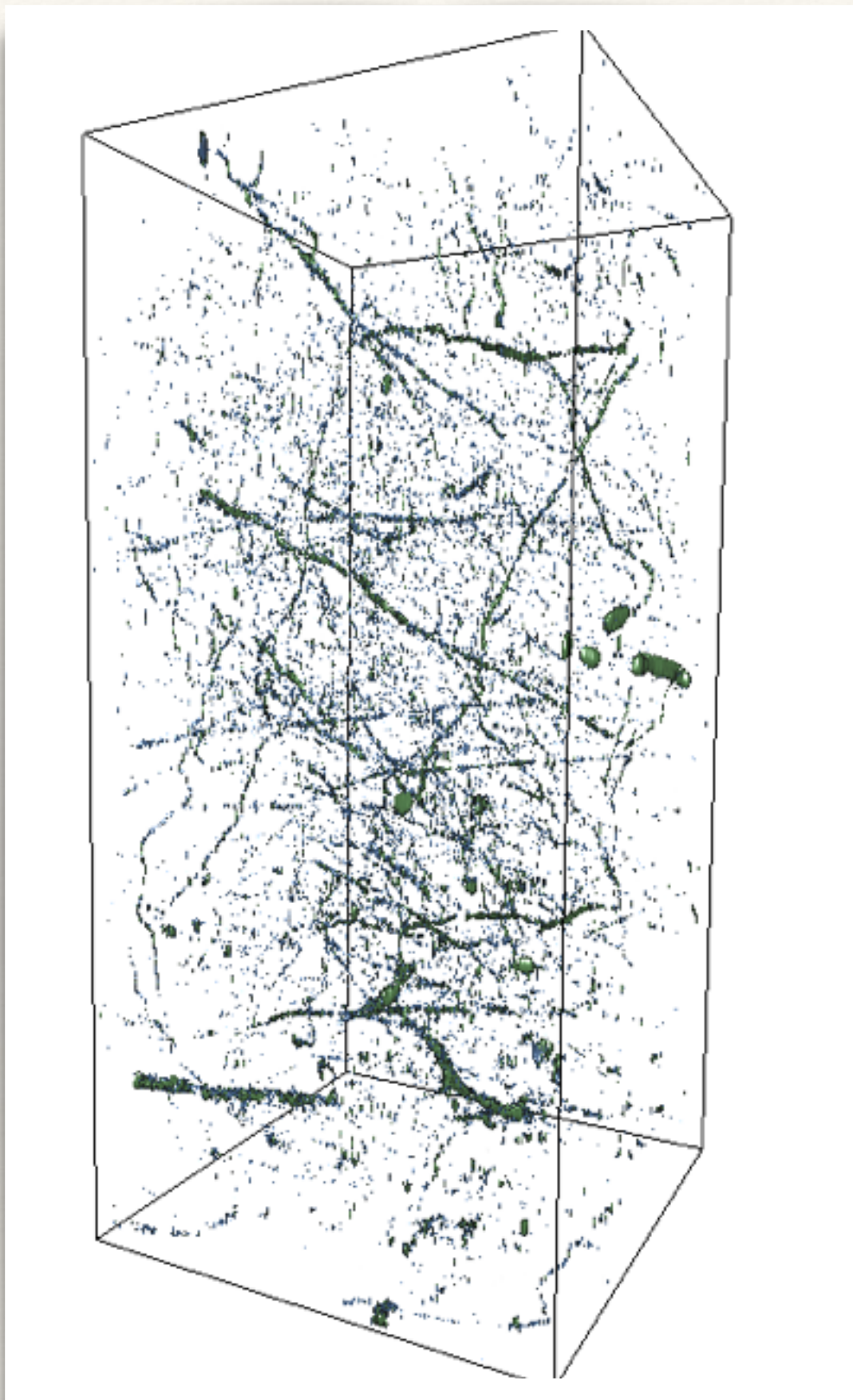


# ViSUS framework

- ❖ Analisi e visualizzazione in streaming;
- ❖ Approccio progressivo;
- ❖ Visualizzazione “on-the-fly”;
- ❖ Accesso di dati da remoto;
- ❖ Gestione semplice ed interattiva simultanea da parte di differenti utenti;
- ❖ In futuro, possibilità di visualizzare i dati durante l’acquisizione;



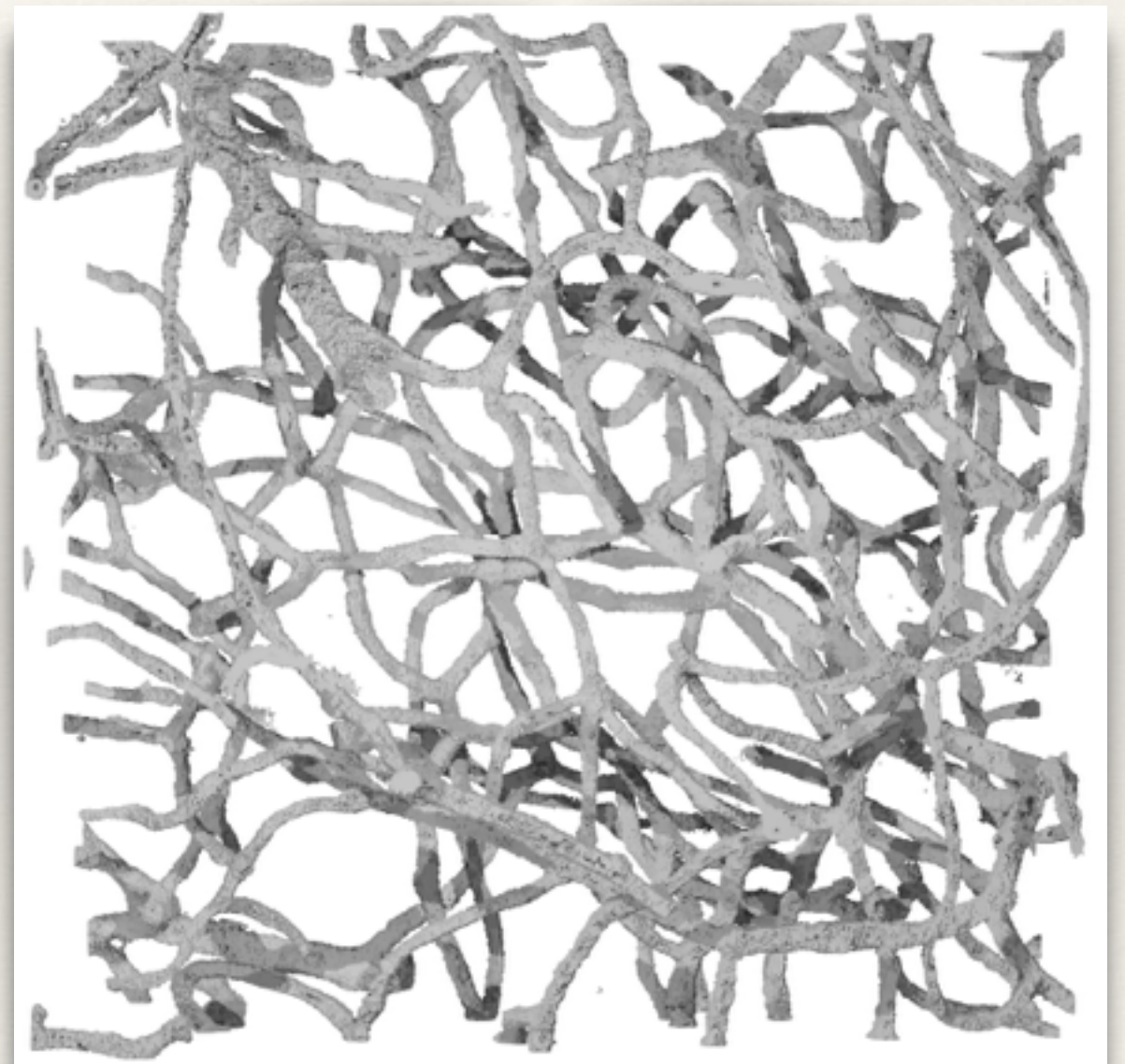






# LAR framework

- ❖ Immagini a massima risoluzione;
- ❖ Modelli esatti, privi di errore di calcolo;
- ❖ Semplificazione.





# Tecniche istologiche

---

# CLARITY

---

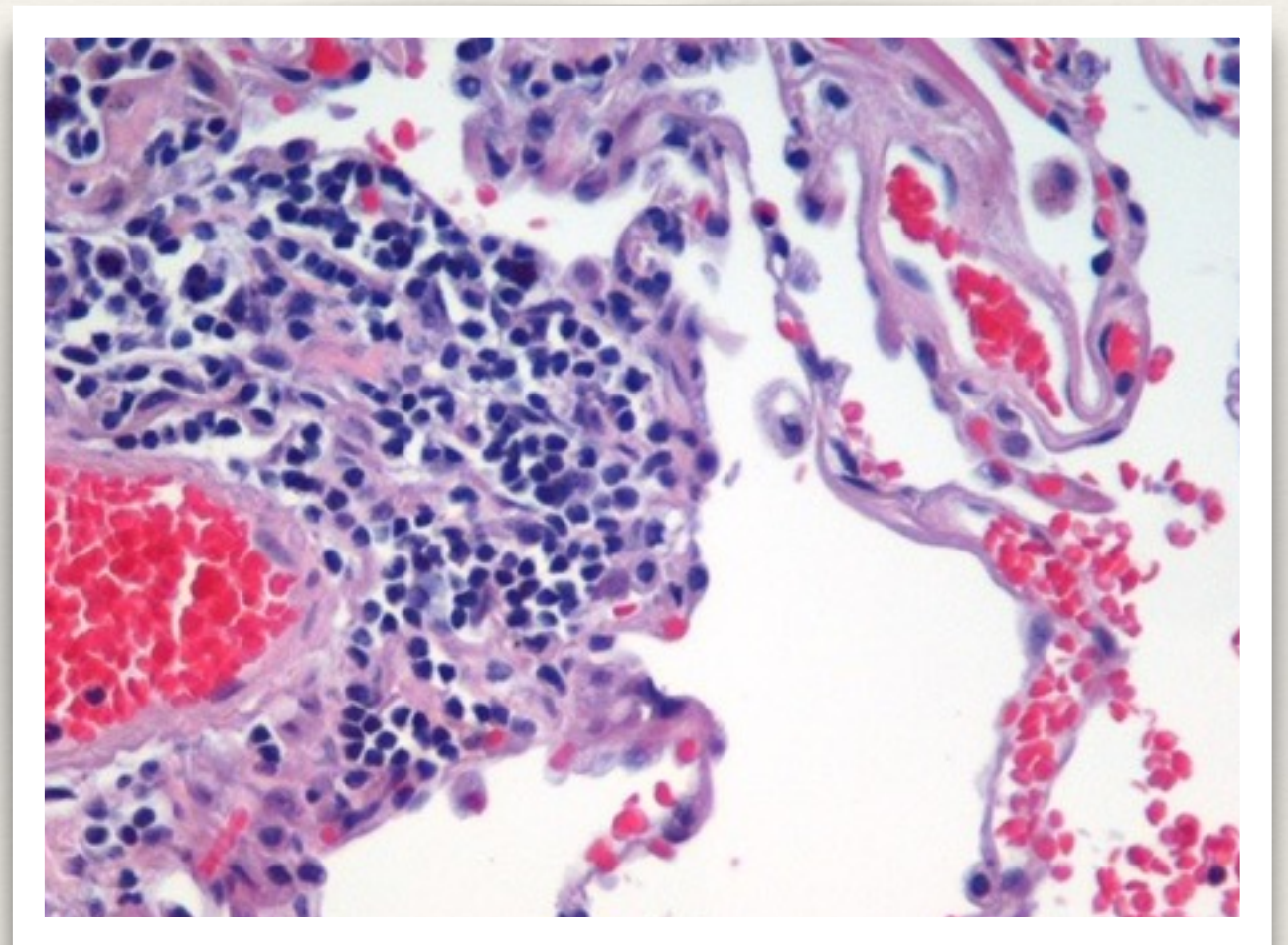
“Transformation of intact biological tissue into a hybrid form in which specific components are replaced with exogenous elements that provide new accessibility or functionality.”

– Chung, K.; Wallace, J.; Kim, S. Y.; Kalyanasundaram, S.; Andalman, A. S.; Davidson, T. J.; Mirzabekov, J. J.; Zalocusky, K. A.; Mattis, J.; Denisin, A. K.; Pak, S.; Bernstein, H.; Ramakrishnan, C.; Grosenick, L.; Gradinaru, V.; Deisseroth, K. (2013). “Structural and molecular interrogation of intact biological systems”. *Nature* **497** (7449): 332–337.



# Tecniche di colorazione

- ❖ Colorazioni istologiche;
- ❖ Immunoistochimica;
- ❖ Immunofluorescenza;
- ❖ Immunogold;

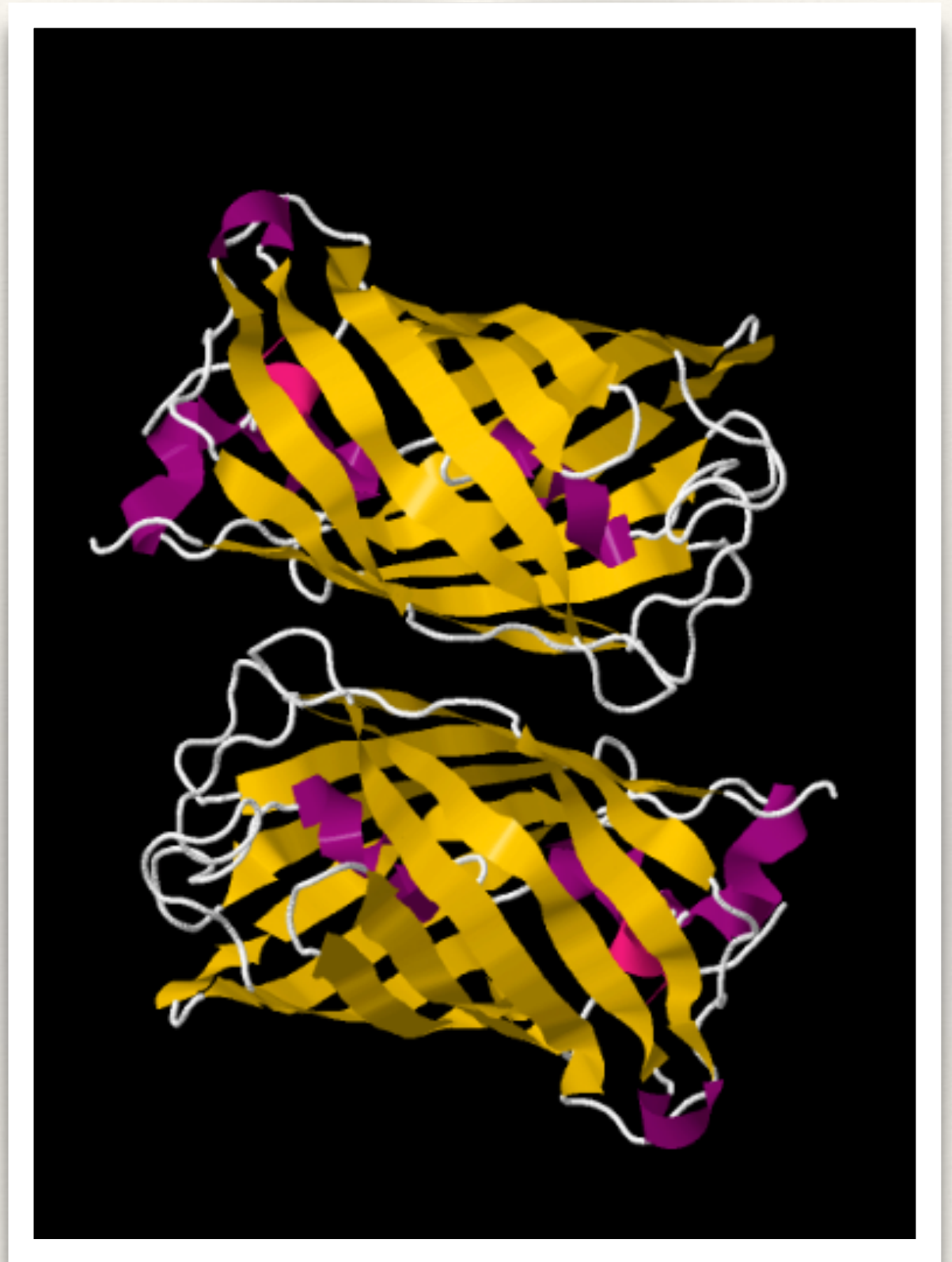


*Fig. Colorazione con ematossilina-eosina.*



# Marcatura fluorescente

- ❖ Tecnica che non prevede necessariamente fissazione ed è compatibile con tessuti vivi;
- ❖ Medusa *Aequorea victoria*;
- ❖ Emette un fotone nella regione verde dello spettro di luce;
- ❖ Struttura:
  - ❖ primaria: 238 amminoacidi;
  - ❖ secondaria: 11 foglietti beta e 2 alfa elica
  - ❖ dominio: beta barile



---

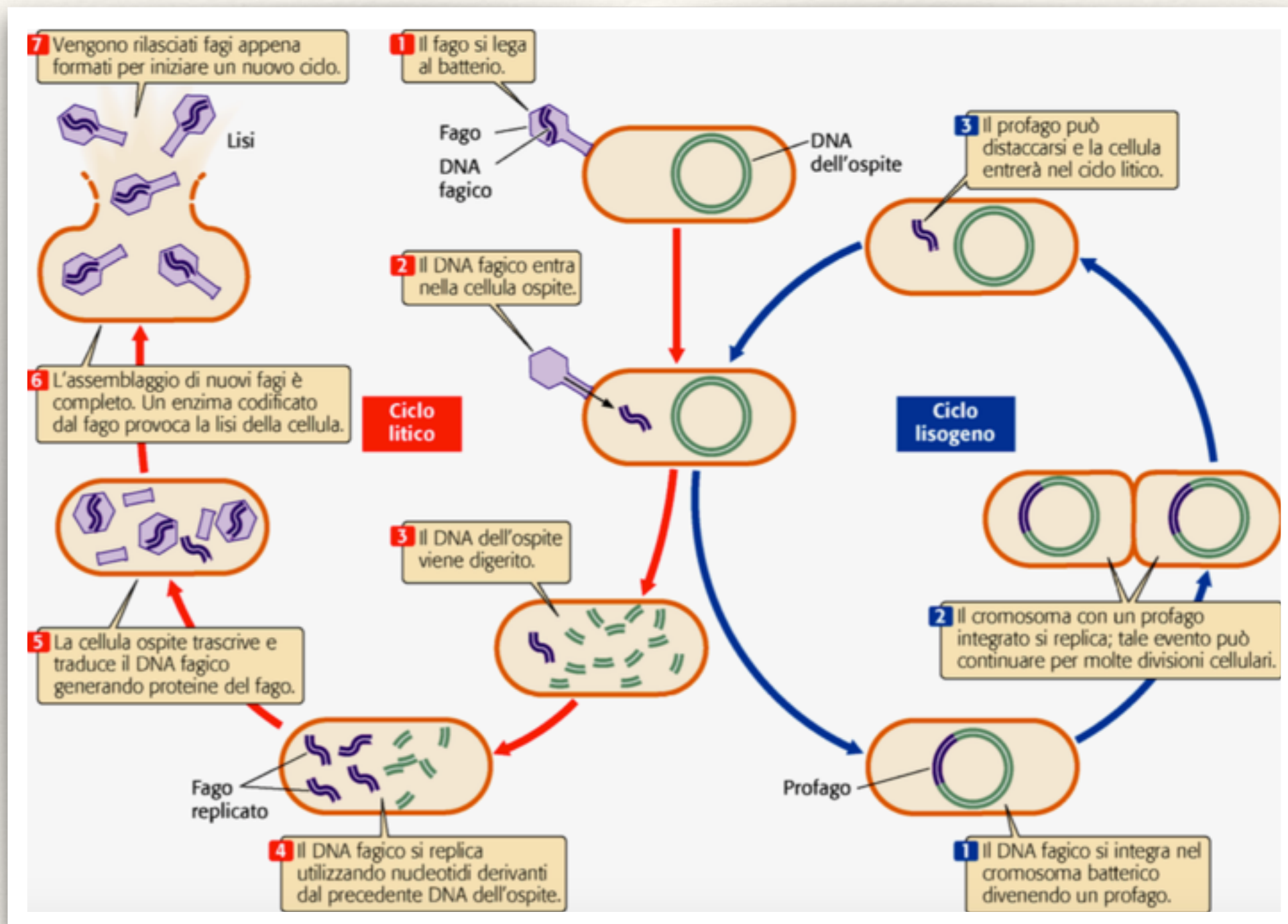
# Virione

---

- ❖ Materiale genetico costituito da DNA o RNA, lunghe molecole che trasportano le informazioni genetiche;
- ❖ Rivestimento proteico, chiamato capside, che circonda e protegge il materiale genetico;
- ❖ In alcuni casi, sacca di lipidi che circonda il rivestimento proteico.



# Ciclo litico e lisogeno





---

# Virus adeno-associati

---

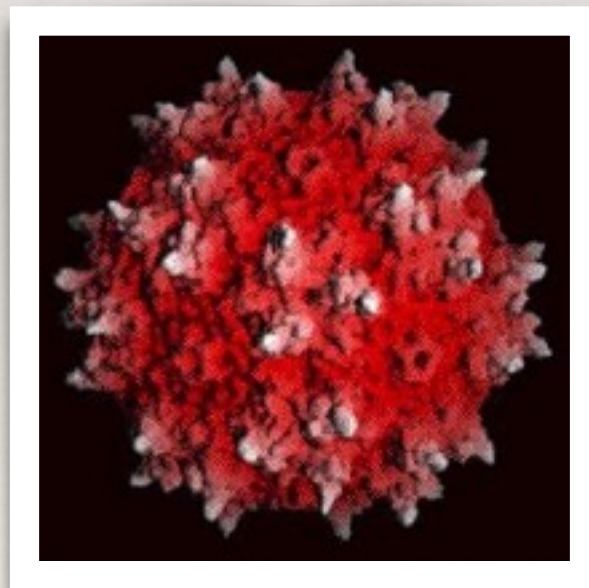
- ❖ Piccolo (25 nm);
- ❖ Elica a singolo filamento di DNA;
- ❖ Due tipi di geni:
  - ❖ cap: proteine del capsid;
  - ❖ rep: proteine per replicazione ed integrazione;
- ❖ Struttura capsid: icosaedrico;
- ❖ Virus difettivi: non sono in grado di replicarsi in assenza di virus helper (Adenovirus o Herpesvirus);
- ❖ In presenza di virus helper, ciclo litico, con produzione di virioni; in assenza integrazione fino a superinfezione con AV o HSV;
- ❖ Capacità di infettare sia cellule in divisione che non;
- ❖ Assenza apparente di patogenicità;
- ❖ 11 sierotipi noti;
- ❖ Ogni sierotipo infetta più tessuti diversi.

---

# AAV sierotipo 9

---

- ❖ Esprime proteine fluorescenti all'interno dei neuroni infettati;
- ❖ In grado di attraversare le barriere venose nel cervello per etichettare il SNC;
- ❖ Virus geneticamente modificato:
  - ❖ Eliminazione dei geni cap e rep per replicazione del DNA e assemblaggio del capsido, per evitare la lisi e creare spazio per l'inserito di DNA esogeno;
  - ❖ Il DNA esogeno elimina la necessità di infettare la cellula con Adenovirus helper.





---

# Altre fasi di preparazione

---

- ❖ Fissazione: previene la decomposizione dei tessuti;
- ❖ Disidratazione;
- ❖ Sezionamento tramite:
  - ❖ microtomo:  $4\mu\text{m}$ ;
  - ❖ ultramicrotomo: fino a poche decine di nm.



# Microscopia di fluorescenza



- ❖ A due fotoni;
- ❖ Risoluzione: fra i 10 e i 50 nm.

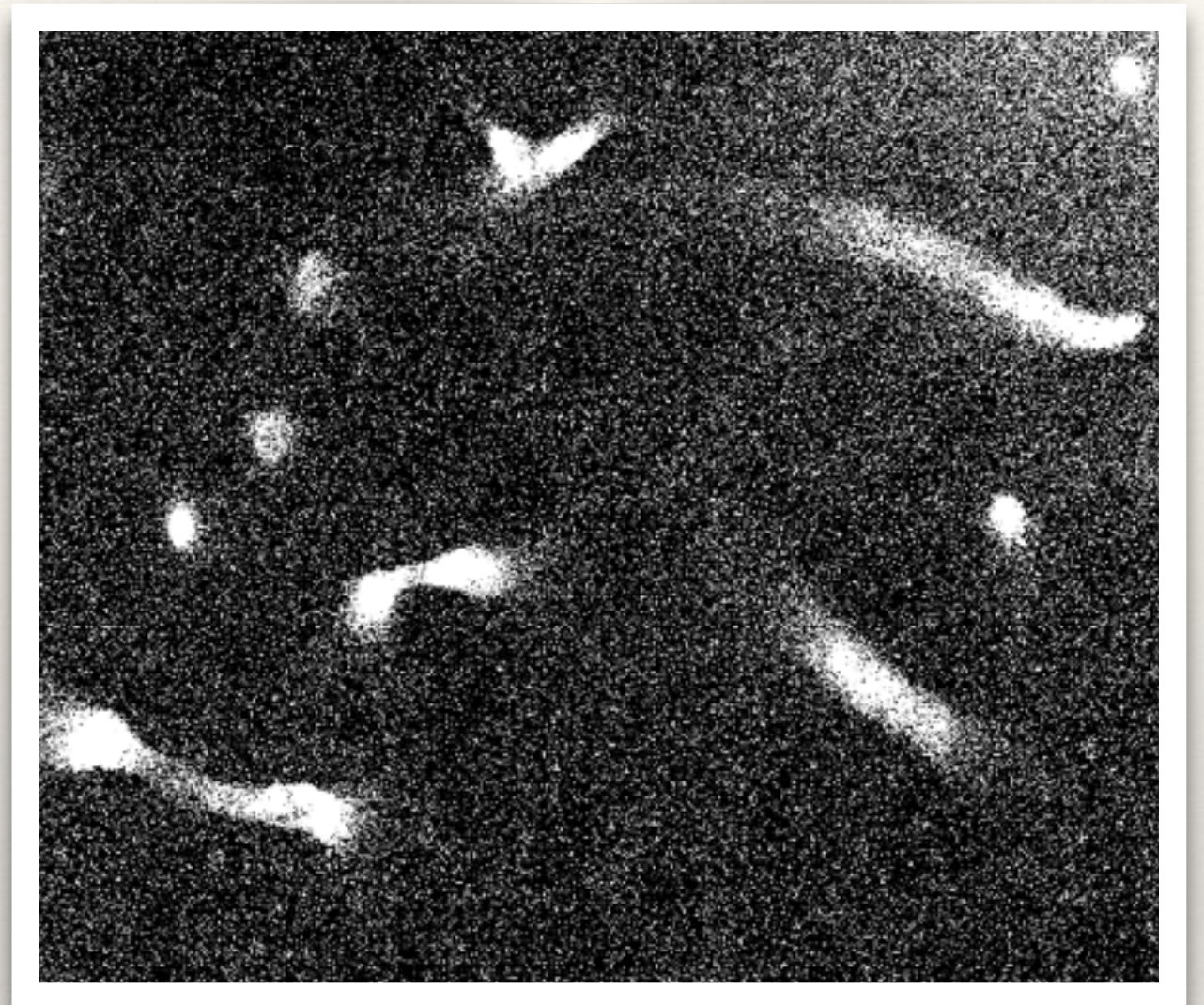


---

# Memorizzazione dei dati

---

- ❖ Pila di immagini 2D, dove ogni immagine è una griglia di pixel pieni o vuoti;
- ❖ Problematiche dovute alla presenza di rumore nei dati.





---

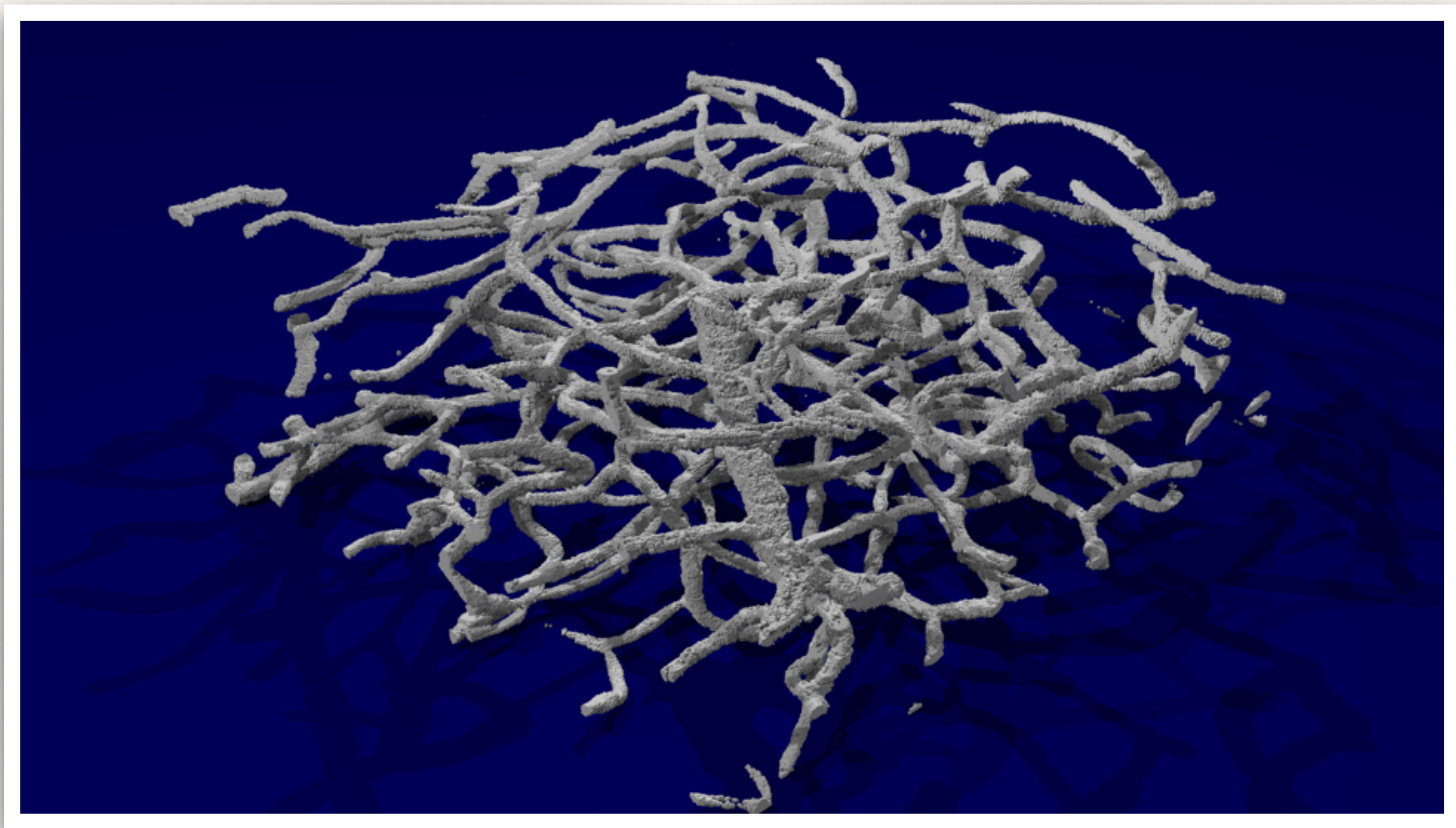
# Limiti dell'approccio

---

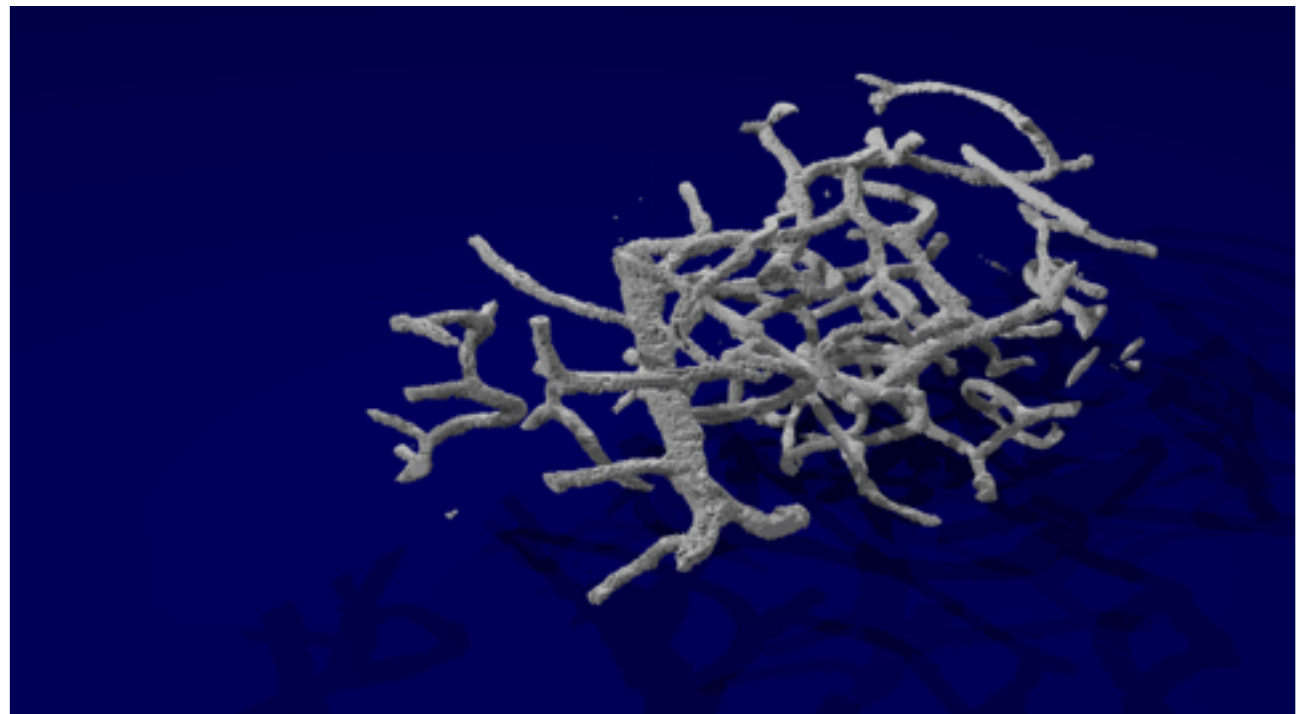
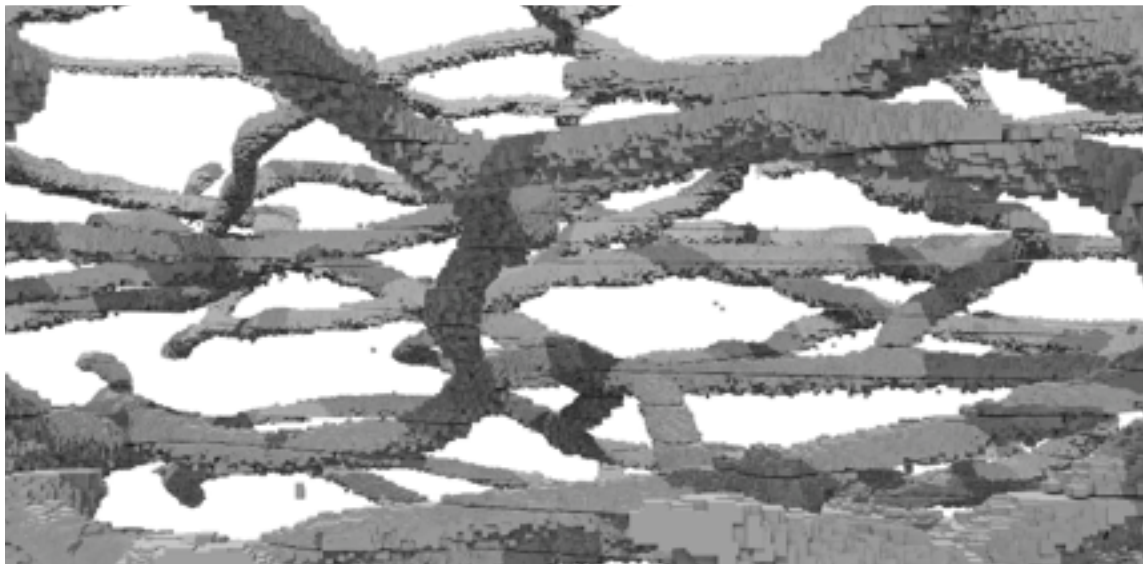
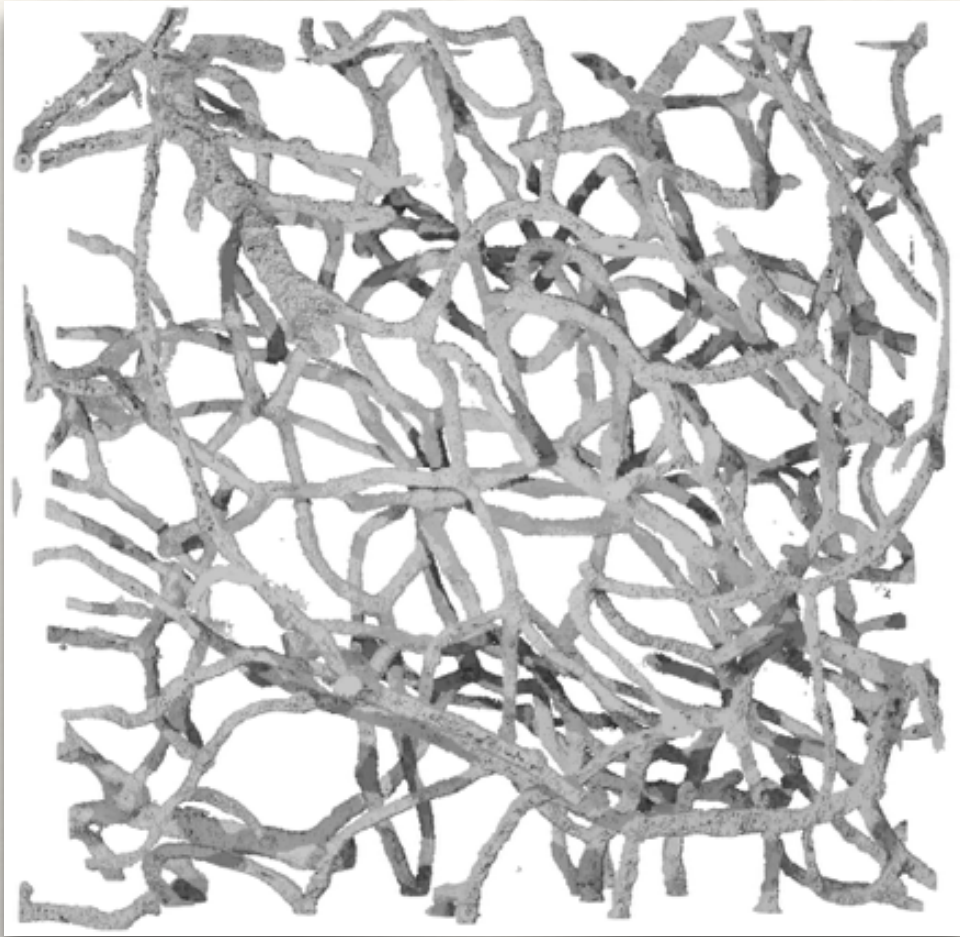
- ❖ Microtomo;
- ❖ Risoluzione;
- ❖ Tempi di acquisizione;
- ❖ Mole di dati;
- ❖ Potenza di calcolo.

# Risultati











---

# Bibliografia

---

- ❖ C. CHRISTENSEN, F. FEDERER, A. GOOCH, S. MERLIN, V. PASCUCCI, A. ANGELUCCI, *Large scale imaging and 3d visualisation of long-range circuits in clarity-treated primate visual cortex*;
- ❖ G.CLEMENTI, D. SALVATI, G. SCORZELLI, A. PAOLUZZI, V. PASCUCCI, *Progressive extraction of neural models from high-resolution 3D images of the brain*;
- ❖ V. PASCUCCI, G. SCORZELLI, B. SUMMA, P. T. BREMER, A. GYULASSY, C. CHRISTENSEN, S. PHILIP, S. KUMAR, *The ViSUS Visualization Framework*.

Grazie per l'attenzione!