



Optische analyse van mitochondriaal transport in zenuwuitlopers

Michiel Martens

Proefschrift voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de nanowetenschappen en de nanotechnologie,
afstudeerrichting Burgerlijk Ingenieur.

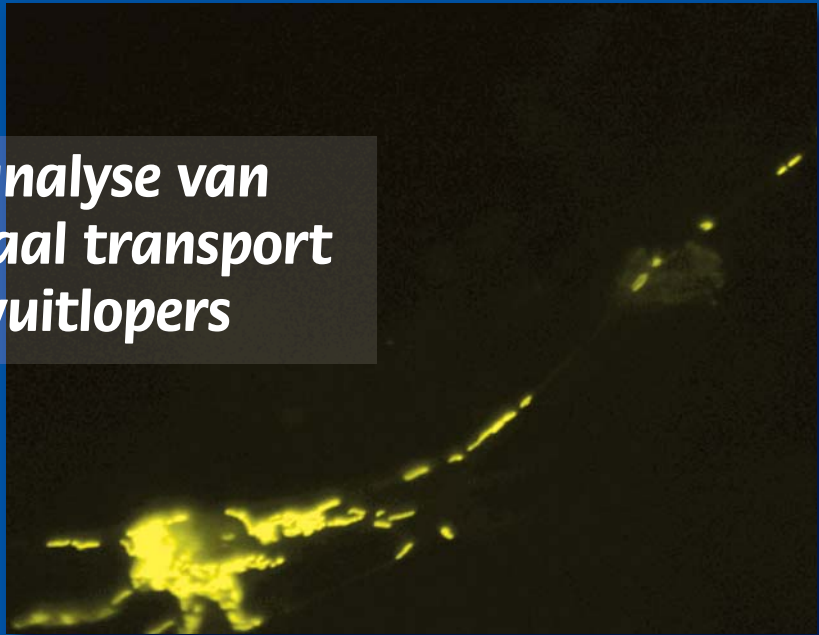
Promotor:

Prof. Dr. Ir. P. Vanden Berghe
Prof. Y. Engelborghs

Academiejaar 2010 - 2011

Master in de nanowetenschappen en de nanotechnologie

Optische analyse van mitochondriaal transport in zenuwuitlopers



Promotor

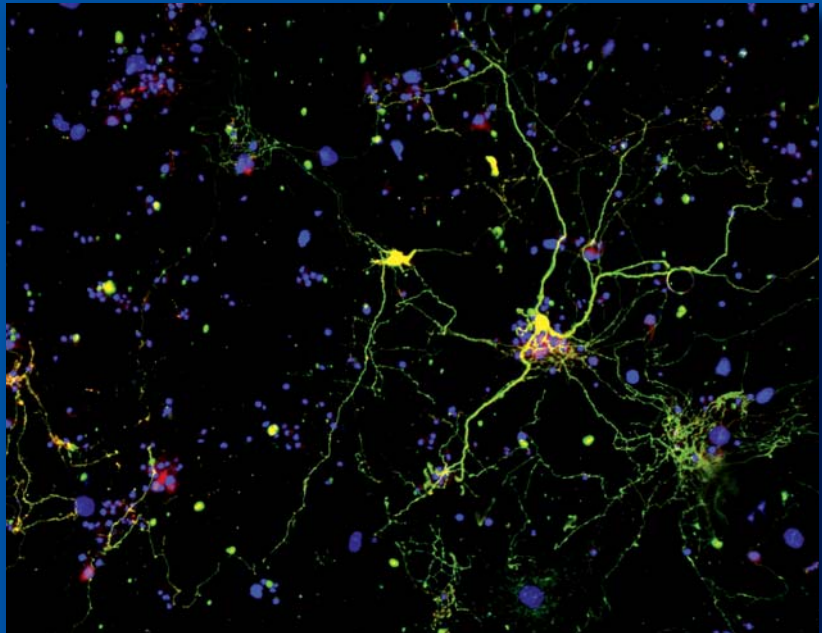
Prof. Dr. Ir. P. Vanden Berghe
Prof. Y. Engelborghs

Dagelijks begeleider

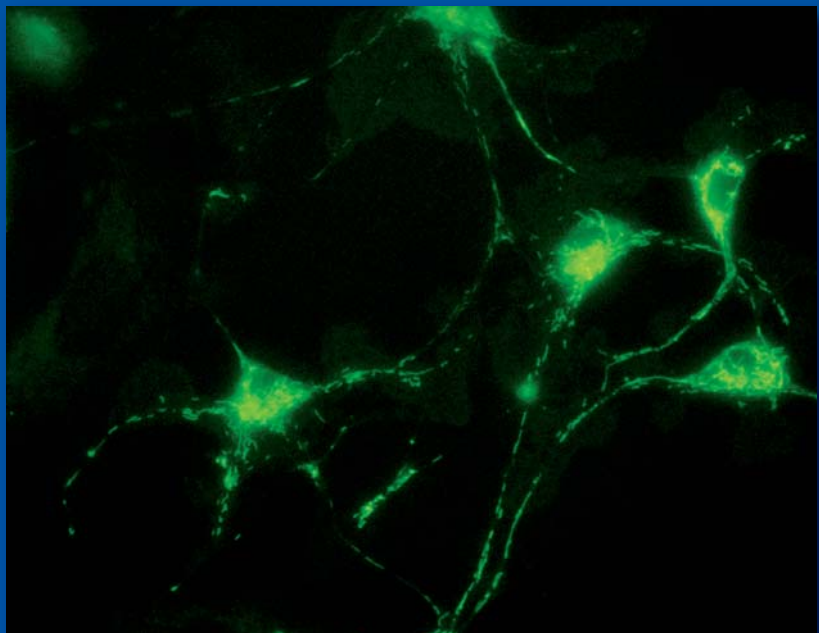
M. Dondeyne

Assessor

G. Borghs
B. Nicolai



**Michiel
Martens**



KULeuven

© Copyright by K.U.Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt U tot K.U. Leuven, Afdeling Gastro-enterologie, Herestraat 49 - box 701, 3000 Leuven, België, +32 16 345750, TARGID@med.kuleuven.be

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

© Copyright by K.U.Leuven

Without written permission of the promoters and the authors it is forbidden to reproduce or adapt in any form or by any means any part of this publication. Requests for obtaining the right to reproduce or utilize parts of this publication should be addressed to K.U. Leuven, Department of Gastro-enterology, Herestraat 49 - box 701, 3000 Leuven, Belgium, +32 16 345750, TARGID@med.kuleuven.be

A written permission of the promotor is also required to use the methods, products, schematics and programs described in this work for industrial or commercial use, and for submitting this publication in scientific contests.

Voorwoord

Zonder hulp zou deze thesis het daglicht niet gezien hebben. Promotors Prof. Dr. Ir. Pieter Vanden Berghe en Prof. Yves Engelborghs dank ik voor de kans die geboden werd om dit werk op het Laboratory for Enteric NeuroScience te realiseren. Prof. Vanden Berghe zorgde voor een prima begeleiding op elk gebied. Dit laatste geldt evenzeer voor mijn begeleidster Marjan Doneyne waarvan ik leerde over de biologische aspecten van dit onderzoek. Biologie behoort namelijk niet tot mijn specialisatie.

Ook bedank ik hen bijzonder voor hun kritische kijk op de bekomen resultaten en de rapportering ervan. Dit zorgt voor een meerwaarde van het eindproduct.

Ik dank ook alle medewerkers van het *Laboratory for Enteric NeuroScience* en in het bijzonder mijn collega-thesisstudente Biomedische wetenschappen Nathalie Weltens voor de vele aangename momenten tijdens en na het werk.

Ook mijn ouders verdienen een plaats in deze dankbetuiging voor de steun die ze me boden tijdens de arbeidsintensieve periode die de voorbereiding van deze thesis meebracht.

Mijn interesse voor wetenschap en technologie in de brede zin van het woord is de drijfveer die resulteerde in deze thesis waarin biologische en technische aspecten werden gecombineerd. Ik hoop dat de lezer deze combinatie kan smaken en het complementaire van interdisciplinair onderzoek naar waarde kan schatten. Voor mij was het combineren van verschillende onderzoeksdomeinen alvast een verrijkende ervaring.

Michiel Martens

*“Opportunity is missed by most people
because it is dressed in overalls and looks like work.”*

[Thomas Edison]

Inhoudstafel

Voorwoord	i
Inhoudstafel	ii
Samenvatting	iii
Lijst met symbolen en afkortingen	iv
1 Inleiding	
1.1 Context en probleemstelling	1
1.2 Activiteiten en werkwijze	2
1.3 Opbouw van het verslag	3
2 Literatuurstudie	
2.1 Het enterisch zenuwstelsel	4
2.2 Mitochondriën	6
2.3 Fluorescentie	15
2.4 Beeldanalyse	20
3 Doelstellingen	23
4 Beschrijving van mitochondriaal transport	
4.1 Inleiding	24
4.2 Materiaal en methoden	24
4.3 Resultaten	31
4.4 Discussie	38
4.5 Besluit	48
4.6 Specifieke transportfenomenen	48
5 Potentiaal-afhankelijkheid van mitochondriaal transport	
5.1 Inleiding	51
5.2 Materiaal en methoden	52
5.3 Resultaten	58
5.4 Discussie	60
5.5 Besluit	64
6 Optimalisatie van de beeldanalyse	
6.1 Inleiding	65
6.2 Igor Pro	66
6.3 Algoritme	69
6.4 Interface	77
6.5 Evaluatie	80
6.6 Perspectieven	88
6.7 Besluit	88
7 Algemeen besluit	
7.1 Inleiding	90
7.2 Conclusie	90
7.3 Toekomstig werk	92
Bijlagen	94
Referenties	122

Samenvatting

Mitochondriaal functieverlies en gebrekkig mitochondriaal transport worden gelinkt aan neurodegeneratieve aandoeningen als de ziekte van Parkinson, de ziekte van Charcot-Marie-Tooth, amyotrofe lateraal sclerose en de ziekte van Alzheimer. Om dit mogelijke verband aan te tonen en verder farmaca te ontwikkelen die inspelen op de betrokken faalmechanismen, dient eerst basisonderzoek verricht te worden om de mechanismen van het mitochondriaal transport te omschrijven en te verklaren.

In deze thesis wordt eerst het mitochondriaal transport beschreven in drie verschillende celtypes van nieuw ontwikkelde primaire celculturen uit het maag-darmstelsel van de muis met behulp van de fluorescente mitochondriale merker *MitoTracker Green*. Uit de resultaten blijkt dat in deze muisculturen met enterische neuronen meer transportactiviteit plaats vindt in (vermoedelijke) fibroblasten maar dat transport in neuronen efficiënter is aangezien voor neuronen minder oscillerende mitochondriën en meer 'rechtstreeks' transport waargenomen is. Ook bewegen de neuronale mitochondriën minder ver en minder lang. Uit de meeste parameters blijkt ook een grotere gelijkenis tussen transport in gliacellen en neuronen. Verder werden in neuronen veel stationaire mitochondriën vastgesteld met een gelijkmatige verdeling over de uitloper. Enkele transfectiemethoden werden uitgeprobeerd om de analyse te vereenvoudigen. Transfecties kunnen een oplossing bieden voor het identificeren van celtypes omdat celspecifieke promotoren in de vector kunnen geïncorporeerd worden en zo celspecifieke kleuring bieden. Het onderscheiden van uitlopers en het identificeren van de bijhorende cellichamen wordt eenvoudiger wanneer naburige cellichamen en uitlopers niet gekleurd zijn of wanneer een bepaald celtype met een specifieke kleuring in beperkte dichtheid voorkomt in de celcultuur.

In een tweede reeks experimenten werd een verband gezocht tussen de mitochondriale membraanpotentiala en de puntsnelheden van mitochondriën. De mitochondriale membraanpotentiala is de drijvende kracht van de ATP-productiecyclus van het mitochondrion. Een correlatie tussen de mitochondriale membraanpotentiala en snelheden van mitochondriën wordt vermoed aangezien aangenomen wordt dat mitochondriën zich verplaatsen naar regio's met hoge energiebehoefte. De mitochondriale membraanpotentiala werd gevisualiseerd met de potentiaalafhankelijke fluorescente merker TMRE die in de mitochondriën accumuleert. Onder de gegeven condities van deze experimenten werd echter geen correlatie tussen de puntsnelheden en de mitochondriale membraanpotentiala gevonden. Verder onderzoek moet uitwijzen of dit typerend is voor enterische neuronen.

Een derde onderdeel richt zich tot de optimalisatie van de beeldanalyse voor het traceren van deeltjes en behandelt de ontwikkeling van een nieuw algoritme dat het spoor van een mitochondrion in de tijd/ruimte-kaart semi-automatisch kan detecteren. Het gebruik ervan verkort de analysetijd drastisch terwijl de gemiddelde accuraatheid vergelijkbaar is met die van een gemiddelde ervaren gebruiker. Daarenboven kan het algoritme een meerwaarde betekenen voor het aanduiden van sterk oscillerende mitochondriën omdat het algoritme de oscillaties in meer details kan volgen dan de gemiddelde gebruiker. De gebruiker heeft voor de markering van de sporen keuze uit de oorspronkelijke aanduidmogelijkheden en deze nieuwe semi-automatische *tool* waardoor het bovenop de tijdswinst meer flexibiliteit biedt. Manuele en automatische lokale correctiemogelijkheden, evenals globale correctie via adaptatieparameters werden bij de automatische *tool* ontwikkeld.

Lijst met symbolen en afkortingen

$[Ca^{2+}]_c$	Cytosolaire calciumconcentratie
$[Ca^{2+}]_i$	Intracellulaire calciumconcentratie
$[Ca^{2+}]_m$	Mitochondriale calciumconcentratie
$[K^+]_o$	Extracellulaire kaliumconcentratie
ADP	Adenosine difosfaat
AIF	Apoptose Inducerende Factor
ATP	Adenosine trifosfaat
Ca^{2+}	Calcium
CAS	Chemical Abstracts Service
CCD	Charge Coupled Device
CMV	Cytomegalovirus
CZS	Centraal zenuwstelsel
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DIC	Differential Interference Contrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ETK	Elektron Transport Keten
EZS	Enterisch zenuwstelsel
$FADH_2$	Flavine adenine dinucleotide
FBS	Foetal Bovine Serum
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
GFP	Green Fluorescent Protein
GUI	Graphical User Interface
H^+	Waterstof
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonzuur
J_1	Besselfunctie van de eerste soort van de eerste orde
JC-1	Binaire fluorescente merker als mitochondriale potentiaalindicator
JetPEI	Polyethylenimine
K^+	Kalium
kDa	kilodalton
LENS	Laboratory for Enteric NeuroScience
MAP	Microtubule Associated Protein
HMW-MAP	High Molecular Weight-Microtubule Associated Protein
MF	Microfilament
MT	Microtubuli
NA	Numerieke apertuur
Na^+	Natrium
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NGF	Nerve Growth Factor
O_2	Zuurstofgas
PGP	Permeability glycoprotein
PSF	Point Spread Function
PTP	Permeability Transition Pore
PZS	Perifeer zenuwstelsel
RFP	Red Fluorescent Protein, een synoniem is DsRed
ROS	Reactive Oxygen Species
TMRE	TetraMethylRodhamine ethyl Ester
TTX	Tetrodotoxine
XFP	Vergemeende term voor een fluorescent proteïne zoals bijvoorbeeld YFP of RFP
YFP	Yellow Fluorescent Protein
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriale membraanpotentiaal

Optische analyse van mitochondriaal transport in zenuwuitlopers

1. Inleiding

1.1 Context en probleemstelling

Mitochondriën zijn organellen die de cel van energie voorzien door productie van ATP. Ze zorgen ook voor calciumbuffering (het regelen van calciumconcentraties via opslag van calciumionen). Deze organellen zijn staafvormig: 200 nm breed en 200 nm tot 10 μm lang. Onderling kunnen ze fusie en fissie ondergaan, vaak in het cellichaam. Ze worden getransporteerd over microtubuli van 5 tot 10 nm diameter van het cellichaam naar plaatsen waar energie nodig is. Synaptische contacten van zenuwcellen zijn hier een typisch voorbeeld van. Dit is de plaats waar twee zenuwcellen communiceren. Zenuwcellen kunnen lange uitlopers hebben waarlangs de mitochondriën zich verplaatsen over afstanden van soms meer dan een meter (vb. motorneuronen). Dit transport is cruciaal voor de goede werking en vitaliteit van de cel. Bij verschillende neurodegeneratieve ziekten is gebrekkig transport vastgesteld. Zowel mitochondriaal functieverlies als dit gebrekkig transport worden gekoppeld aan aandoeningen als de ziekte van Parkinson, de ziekte van Charcot-Marie-Tooth, amyotrofe lateraal sclerose en de ziekte van Alzheimer¹.

Lichtmicroscopie en in het bijzonder fluorescentiemicroscopie is ideaal om dit transport te onderzoeken. Mitochondriën kunnen chemisch gekleurd worden met fluorescente moleculen, waardoor ze *in vitro* traceerbaar zijn onder een fluorescentiemicroscop. Deze techniek biedt een voldoende resolutie en is niet schadelijk voor de cellen binnen een beperkte tijdspanne en met een optimaal protocol. De optische resolutie wordt echter gelimiteerd door diffractie. Optische oversampling en geavanceerde beeldanalyse zullen gebruikt worden om de nauwkeurigheid van de plaatsbepaling van deze kleine organellen te verbeteren (50 nm). De relatie tussen de functies en het transport van de mitochondriën en de vraag waarom hun snelheid en richting zo plots kunnen veranderen, zal onderzocht worden.

1.2 Activiteiten en werkwijze

Op dit ogenblik is relatief weinig gekend over de mechanismen die het mitochondriaal transport controleren. Binnen het algemeen kader om het mitochondriaal transportgedrag en de stimuli die het transport beïnvloeden te verklaren, zullen twee concrete experimenten worden uitgevoerd. *MitoTracker Green*kleuringen laten toe het transport te beschrijven, terwijl met TMRE-kleuringen een verband zal gezocht worden tussen de mitochondriale membraanpotentiaal en het transport. Hierbij wordt het enterisch zenuwstelsel (EZS) als model gebruikt. Dit model is geschikt voor dit onderzoek daar verondersteld wordt dat er geen fundamentele verschillen zijn in mitochondriaal transport in zenuwcellen afkomstig van een verschillend zenuwstelsel. Bovendien is er toegang tot zowel dierlijk (muis, cavia, ...) als menselijk EZS weefsel.

Bij het begin van dit project (september 2010) is de betrokken vakgroep *Lab for Enteric NeuroScience* (LENS) overgeschakeld van caviaculturen naar een meer algemeen aanvaard model, namelijk muisculturen. Daardoor was karakterisatie van deze nieuwe muisculturen noodzakelijk om de soorten cellen in deze culturen te identificeren. Door de beperkte tijdsperiode waarin zowel deze karakterisatie als dit project uitgevoerd werd, is dit onderzoek gedi- versifieerd naar de verschillende andere celtypen in deze culturen. Er is nog maar weinig onderzoek gebeurd naar transport van mitochondriën in cellen zoals bijvoorbeeld fibroblasten, gliacellen of spiercellen. Mitochondriaal transport is het meest onderzocht in neuronen omdat bij verschillende neurodegeneratieve aandoeningen een gebrekkig mitochondriaal transport en abnormale mitochondriale verdelingen werden vastgesteld².

Onderzoek naar mitochondriaal transport in neuronen zou een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het begrijpen van neurodegeneratie. Na de opnames van zowel de *MitoTracker Green*-experimenten als de TMRE-experimenten worden analyses uitgevoerd met specifieke software (Igor Pro, Wave-metrics, OR, VSA) waarbij transport van en naar het cellichaam geregistreerd wordt in de uitlopers van de verschillende celtypen. De grote hoeveelheid verkregen data wordt daarna statistisch verwerkt om tot conclusies te komen. Als tweede luik van dit project wordt de computeranalyse zelf geoptimaliseerd. De bestaande software *tools* worden uitgebreid met een zelfontwikkeld algoritme

dat semi-automatische aanduiding van uitlopers en sporen (zie 2.4) mogelijk maakt. Dit nieuwe algoritme wordt ondersteund door een gebruikersinterface en een aantal parameters zijn ingevoegd zodat de gebruiker de automatische aanduiding naar wens kan manipuleren.

In dit project worden fundamentele, initiële stappen gezet in het onderzoek dat kan leiden tot nieuwe geneesmiddelen en behandeling van neurodegeneratieve ziekten.

1.3 Opbouw van het verslag

In de **inleiding** wordt eerst de context en probleemstelling van de thesis toegelicht. De relevantie van dit fundamenteel onderzoek wordt aangegeven. Verder dient de inleiding als situatieschets en overzicht waarbij de activiteiten en werkwijze en de opbouw van het verslag kort worden beschreven.

Nadien volgt een uitgebreide **literatuurstudie** die de huidige kennis over de verschillende aspecten van de thesis behandelt: de biologische context wordt ruim besproken, evenals de gebruikte techniek (fluorescentiemicroscopie) en de gebruikte moleculen. De literatuurstudie bevat ook een meer algemeen stuk over computerondersteuning van biologisch onderzoek. Dit stuk is algemener omdat na het lezen van hoofdstuk 6 zal blijken dat de computerondersteuning voor dit project heel specifiek is en een eigen, creatieve oplossing noodzakelijk was.

Vervolgens worden de **doelstellingen** van dit project bondig omschreven, waarna verschillende hoofdstukken volgen die de uitwerking van de experimenten bevatten om deze doelstellingen te bereiken.

In een eerste hoofdstuk worden de **MitoTracker Green-experimenten** voor de beschrijving van het mitochondriaal transport uitgewerkt. Hierin is ook een beperkt beschrijvend stuk opgenomen over **transfecties**. In het volgende hoofdstuk worden de **TMRE-experimenten** omschreven waarbij een link wordt gezocht tussen mitochondriale 'functie' (membraanpotential) en transport. Het laatste hoofdstuk bevat uitgebreide toelichting van het werk dat gebeurde om de **computeranalyse** te optimaliseren.

Ten slotte wordt een overzicht gegeven van de **conclusies** en worden suggesties gedaan voor toekomstige experimenten.

2. Literatuurstudie

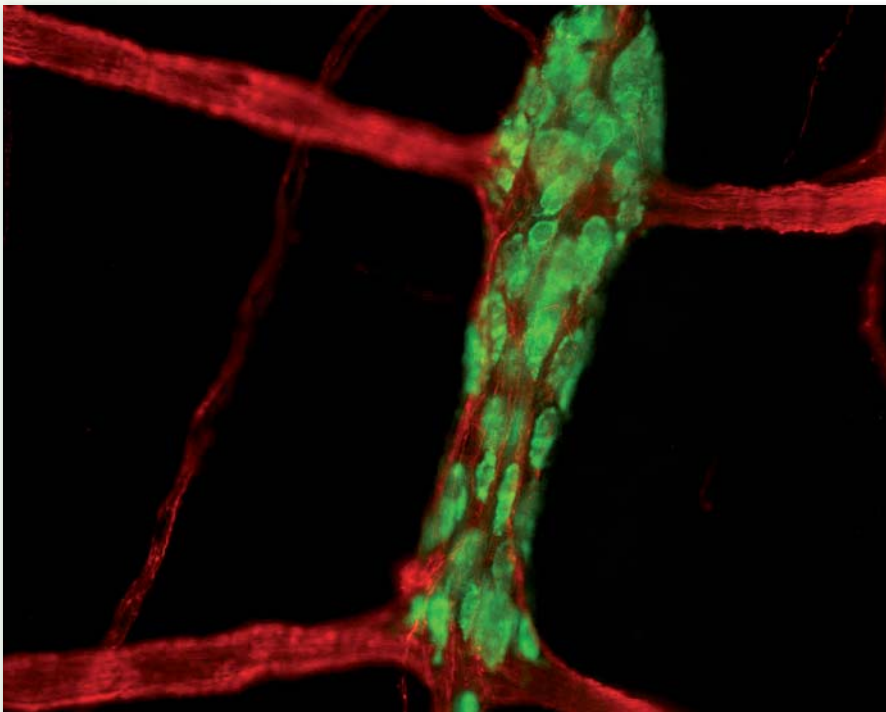
2.1 Het enterisch zenuwstelsel

2.1.1 Bouw en functie

Het enterisch zenuwstelsel (EZS) reguleert de functie van het gastro-intestinaal stelsel en maakt deel uit van het perifere zenuwstelsel (PZS). Het PZS is dat deel van het zenuwstelsel dat buiten het centraal zenuwstelsel (CZS) gelegen is en waartoe ook de verbindingen van en naar de organen behoren. De regeling van het gastro-intestinaal systeem gebeurt autonoom³.

Het EZS bevat ongeveer honderd miljoen neuronen^{4,5} die samen gebruik maken van meer dan 30 neurotransmitters. De meeste hiervan komen ook voor in het CZS, waaronder acetylcholine, dopamine en serotonine⁶.

Enterische neuronen bestaan uit cellichamen (Figuur 2 - 1 groen) en hun uitlopers (Figuur 2 - 1 rood) die in een netwerk of plexus georganiseerd zijn. Het EZS bestaat uit twee plexus: de myenterische (Figuur 2 - 2 geel) en de submucosale plexus (Figuur 2 - 2 geel). Ze worden respectievelijk ook Auerbach's en Meissner's plexus genoemd naar de personen die de laag eerst beschreven: Leopold Auerbach en Georg Meissner. Het EZS bevindt zich in



Figuur 2 - 1: Enterische neuronen (cellichaam groen, uitlopers rood) zijn georganiseerd in een plexus.

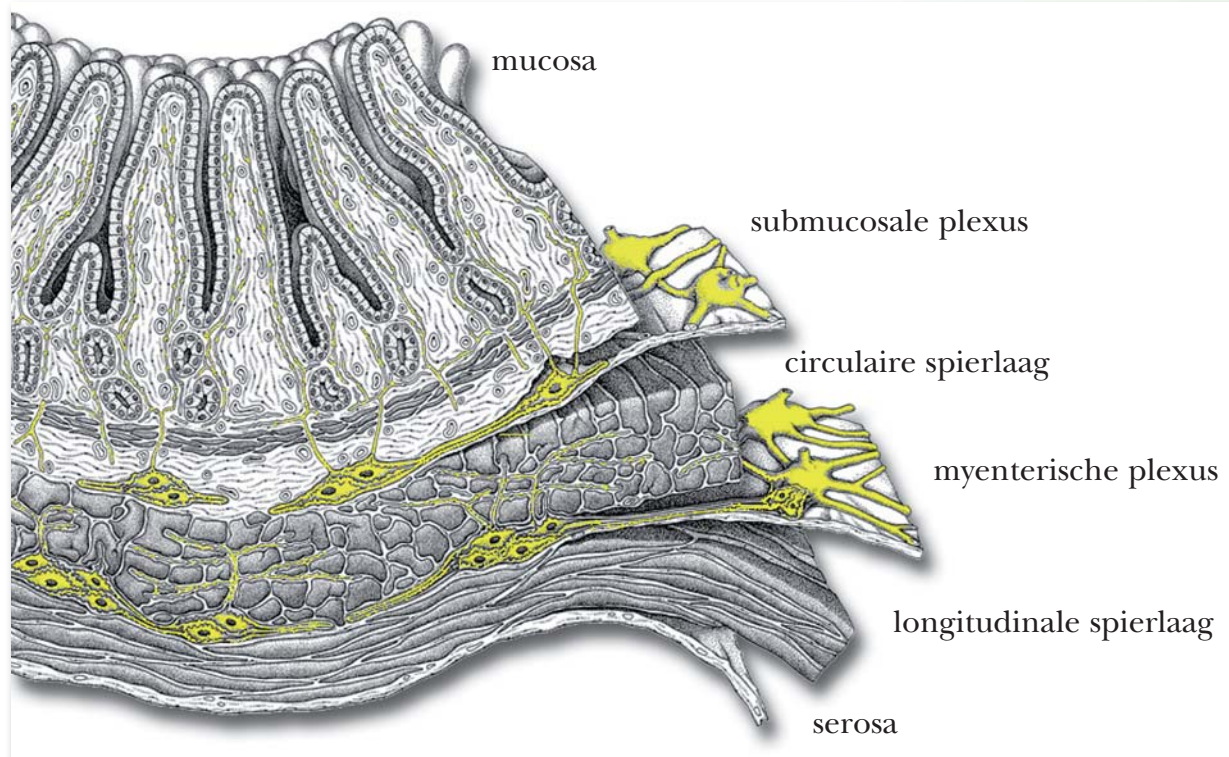
de wand van het hele gastro-intestinale stelsel zowel in de maag als ook dunne en dikke darm. De darmwand is opgebouwd uit verschillende weefsellagen met elk een eigen functie. Van buiten naar binnen bevinden zich de serosa, de longitudinale spierlaag, de myenterische plexus, de circulaire spierlaag, de submucosale plexus en de mucosa (Figuur 2 - 2). Deze lagen zorgen samen

voor de correcte werking van de darm. De myenterische plexus die vooral de darm motorisch controleert, bevindt zich tussen de longitudinale en de circulaire spierlaag, terwijl de submucosale plexus zich in de submucosa bevindt en de secretie en absorptie van nutriënten door de mucosa regelt.

Het CZS is verbonden en interageert met het EZS via efferente en afferente neuronen die synaptische contacten maken binnen de gastro-intestinale tractus. Efferente neuronen dragen impulsen van het CZS naar de organen, terwijl afferenten impulsen overbrengen vanuit de periferie naar het CZS. Deze neuronen vormen echter geen onderdeel van het enterisch zenuwstelsel.

2.1.2 Neuronale activiteit

Een neuronale actiepotentiaal is het gevolg van een kortstondige (ms) influx van Na^+ (ook Ca^{2+}) in het cytosol van de neuronen waardoor de membraanpotentiaal depolariseert. Miliseconden later openen kaliumkanalen zich en is er K^+ -efflux. Neuronale activiteit gaat gepaard met stijging van de intracellulaire calciumconcentratie ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Ca^{2+} komt binnen via ionenkanalen in het plasmamembraan en komt vrij uit intracellulaire opslagplaatsen^{7,8}.



Figuur 2 - 2: De verschillende weefsellagen van de dunne darm.

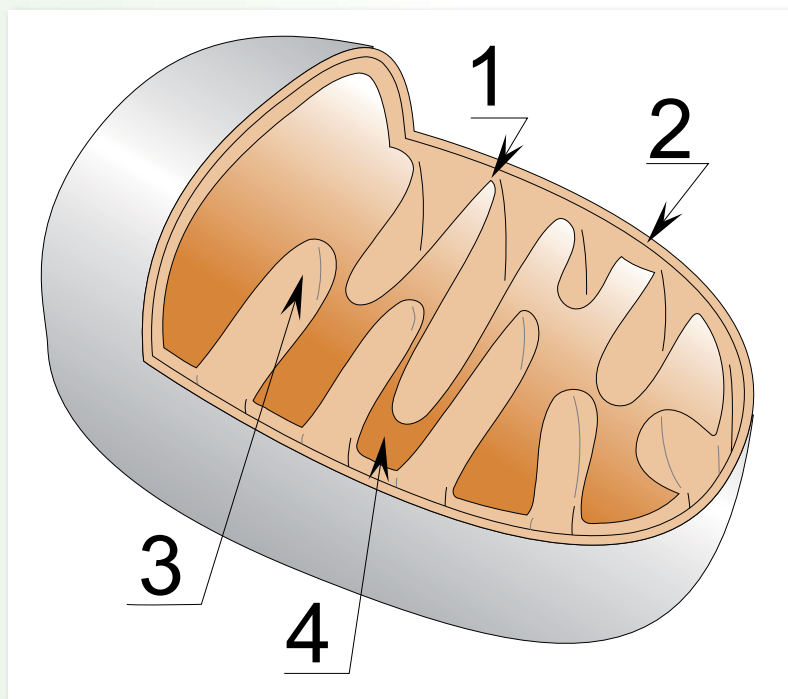
Na deze activatie wordt de exciteerbaarheid van de neuronen hersteld door repolarisatie via moleculaire pompen en ionenuitwisselaars. In het centraal zenuwstelsel zijn deze processen goed voor 60 tot 80 procent van het energieverbruik; de overige energie wordt voornamelijk voor neurotransmissie gebruikt. Omwille van deze hoge energiebehoefte zijn neuronen goed uitgerust om glucose te verwerken. Zo beschikken ze over een uitgebreid mitochondriaal netwerk dat later besproken wordt.

Neuronen kunnen *in vitro* geactiveerd worden door elektrische stimulatie, lokale applicatie van neurotransmitter of verhogen van de extracellulaire K^+ -concentratie ($[K^+]_o$)⁹.

2.2 Mitochondriën

2.2.1 Bouw en functie

Mitochondriën komen voor in verschillende groottes en vormen, gaande van kleine sferen of korte staafvormen tot langwerpige tubuli met een diameter van ongeveer 200 nm en een lengte tussen 200 nm en 10 μm . De vorm van mitochondriën beïnvloedt vooral in gepolariseerde cellen zoals neuronen hun mogelijkheid tot subcellulaire verdeling¹⁰. Een vormverandering naar



Figuur 2 - 3: De structuur van een mitochondrion. 1: binnenmembraan. 2: buitenmembraan. 3: intermembranaire ruimte. 4: matrix.

meer granulaire mitochondriën kan een vroeg teken zijn van schade aan de cel of apoptose¹¹.

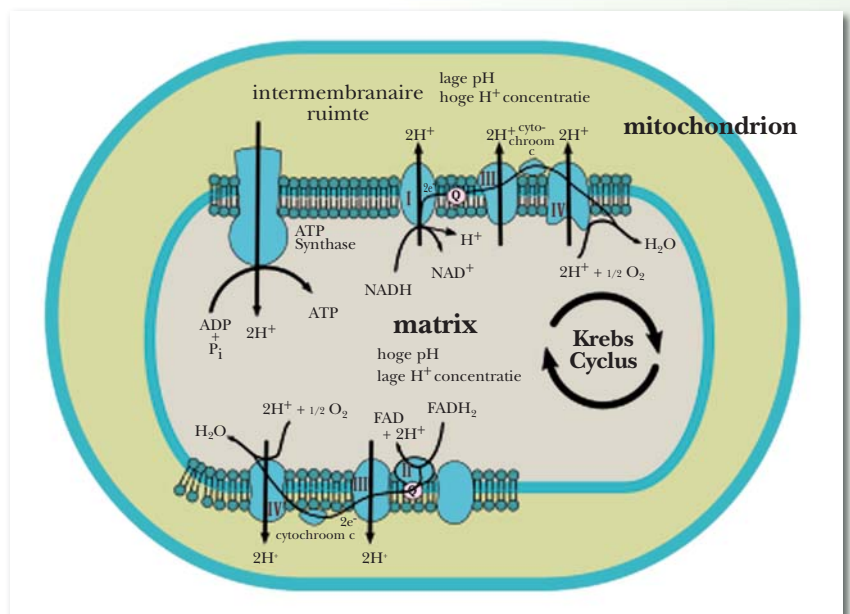
Mitochondriën hebben een binnen- en buitenmembraan met tussenin de intermembranaire ruimte. De centrale ruimte van een mitochondrion, omringd door het binnenmembraan, heet de matrix (Figuur 2 - 3). Het buitenmembraan bevat een groot aantal ingebedde proteïnen die diffusie van moleculen tot 5 kDa mogelijk maken. Door deze gefaciliteerde diffusie door het buitenmembraan

zijn kleine moleculen zoals ionen en suikers in de intermembranaire ruimte in dezelfde concentratie aanwezig als in het cytosol. Grotere moleculen kunnen via een actief mechanisme in de intermembranaire ruimte overgebracht worden. De proteïnesamenstelling is er daarom anders dan in het cytosol. In de intermembranaire ruimte zijn proteïnen als apoptose-inducerende factor (AIF) en cytochroom c aanwezig die een rol spelen bij apoptose, een vorm van geprogrammeerde celdood.

De samenstelling van het binnenmembraan en de aanwezige membraanproteïnen zorgen ervoor dat minder soorten stoffen in de matrix terecht komen dan in de intermembranaire ruimte. Dit membraan bevat onder meer proteïnen die een potentiaalverschil van 150 - 180 mV over het membraan regelen en in stand houden, de mitochondriale membraanpotentiaal ($\Delta\Psi_m$). Verschillende ionenkanalen en transportsystemen dragen bij tot, maar zijn ook afhankelijk van, $\Delta\Psi_m$.

De elektrontransportketen (ETK) verantwoordelijk voor oxidatieve fosforylatie, wordt gedreven door $\Delta\Psi_m$ en bestaat uit vier complexen: Complex I (NADH ubiquinon oxidoreductase), complex II (succinaat dehydrogenase), complex III (ubiquinol cytochroom c oxidoreductase) en complex IV (cytochroom c oxidase) (Figuur 2 - 4). Via deze complexen worden elektronen overgedragen van de cofactoren NADH en $FADH_2$ naar O_2 . De reacties van complexen I, III en IV brengen een protontransfer tot stand van de mitochondriale matrix naar de

intermembranaire ruimte. Hierdoor ontstaat een potentiaalverschil over het binnenmembraan. $\Delta\Psi_m$ en de protongradiënt drijven de protonen terug naar de matrix door complex V (F₀F₁ - ATP synthase) zodat ATP gegenereerd wordt. ATP-synthase katalyseert de laatste stap van de ATP-synthese en produceert ATP in de



Figuur 2 - 4: De mitochondriale elektrontransportketen.

matrix. Het F₀ deel van het ATP-synthasecomplex zit in het membraan, terwijl het F₁ deel uit het membraan steekt in de mitochondriale matrix. De c-proteïnen van het F₀-deel roteren, aangedreven door de grote, inwaarts georiënteerde protongradiënt. Voor elke 120 graden wordt een ATP gesynthetiseerd ter hoogte van de α - en β -subeenheden van F₁.

De membraanpotentiaal is dus de drijvende kracht achter de ATP-productie en bijgevolg een cruciale parameter voor goed functionerende mitochondriën, gezien de voornaamste rol van deze organellen als ATP-producenten. De ATP-productiecyclus begint bij glucose, dat afgebroken wordt tot pyrodruivenzuur tijdens de glycolyse. Pyruvaat, het zout van pyrodruivenzuur en een metabool van glucose uit de glycolyse, is het belangrijkste energiesubstraat voor de krebscyclus^{12,13}. De krebscyclus levert NADH en FADH₂ voor de ETK die op zijn beurt ATP genereert. Neuronen zijn sterk afhankelijk van hun mitochondriën vanwege hun hoge energieverbruik.

Neuronale mitochondriën staan ook in voor lokale calciumbuffering: ze nemen tijdens synaptische activiteit Ca²⁺ op afkomstig van verschillende bronnen^{14,15}. Individuele mitochondriën kunnen echter een voorkeur hebben voor één specifieke Ca²⁺ bron afhankelijk van de locatie in het cytosol^{16,17,18}.

Mitochondriën bevatten verschillende systemen voor de opname en afgave van Ca²⁺. De Ca²⁺-uniporter transporteert selectief Ca²⁺ doorheen het binnenmembraan¹⁹. Door een sterke elektrochemische gradiënt worden Ca²⁺-ionen via deze uniporter naar de matrix getransporteerd. Hierbij wordt geen energie verbruikt. Doordat de Ca²⁺-ionen uit het cytosol accumuleren in de matrix via de mitochondriale Ca²⁺-uniporter hebben mitochondriën een calciumbufferende werking^{20,21}.

Uitwisselaars of antiporters zijn membraanproteïnen die secundair actief membraantransport teweegbrengen. Door de Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar in het binnenmembraan worden drie Na⁺-ionen inwaarts getransporteerd onder invloed van hun elektrochemische potentiaal. Dit drijft één Ca²⁺-ion tegen zijn elektrochemische gradiënt in naar buiten. Deze Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar is de belangrijkste weg waarlangs Ca²⁺-ionen worden afgevoerd uit de matrix. Omdat deze trager is dan de Ca²⁺-uniporter is er netto accumulatie van Ca²⁺

mogelijk in mitochondriën. Calcium zou een rol spelen in apoptose door een calcium *overload* in de mitochondriën te veroorzaken. De *permeability transition pore* (PTP) zou hierbij cruciaal zijn door de regeling van verschillende proteïneconcentraties. De PTP is een proteïnecomplex gelegen, daar waar het binnenmembraan in contact komt met het buitenmembraan van het mitochondrion en is een hoog-permeabel, niet-selectief kanaal^{22, 23}.

2.2.2 Beschrijving van het transport

Mitochondriën ontstaan in de celsoma en vormen een dynamisch netwerk^{24, 25, 26}; ze ondergaan transport, fissie en fusie^{27, 28}. In sterk gepolariseerde cellen zoals neuronen moeten zij getransporteerd worden naar afgelegen locaties binnen de cel. Daarom zijn ze in neuronen zeer mobiel in retrograde (naar het cellichaam) of anterograde (weg van het cellichaam) richting in zowel axonen als dendrieten²⁹. Dit transport kan worden beschreven als onregelmatig, met oscillerende snelheden en frequente richtingsveranderingen. Naast het meer 'gericht' transport, 'schommelen' ze soms heen en weer, wat beschreven wordt als een Browniaanse beweging^{30, 31}. Ten slotte kunnen ze ook volledig stationair zijn.

De grootteorde van gemeten mitochondriale snelheden gaat van 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$ tot 0,1-1 $\mu\text{m}/\text{s}$ ^{32, 33, 34, 35} in onder meer rathippocampus en *Drosophila* neuronen. De mitochondriale grootte lijkt niet gecorreleerd aan hun snelheid³⁶, maar snelheden kunnen wel sterk variëren met de temperatuur^{32, 37, 38}.

Axonaal transport wordt opgedeeld in traag (0,001-0,05 $\mu\text{m}/\text{s}$) en snel (0,6-2,9 $\mu\text{m}/\text{s}$) axonaal transport. Mitochondriaal transport, net als het transport van neurotransmittervesikels, wordt ingedeeld bij het snel axonaal transport. Transport van cytoskelet- en cytosoleiwitten zijn dan weer voorbeelden van traag axonaal transport. Verschillende membraneuze organellen zoals endosomen, lysosomen, vesikels en mitochondriën vertonen onderling ook verschillende transportpatronen in het axon³⁹. Dit wijst erop dat er organel-specifieke verschillen zijn in de regulatie van het transport. De gemiddelde snelheid van mitochondriën is lager dan die van andere organellen^{40, 41, 42}. Een intrinsiek tragere motor of het verschil in hogere-orde-bewegingsgedrag kan

hiervan aan de basis liggen: plotse richtingsveranderingen en de vele stationaire mitochondriën zijn kenmerkend in neuronen en dragen bij tot de lagere gemiddelde snelheid.

2.2.3 Het transportsysteem

Mitochondriën worden getransporteerd over de sporen van het cytoskelet^{27, 29}. Het transport kan onderbroken worden door toediening van colchicine, een stof die polymerisatie van tubuline tot microtubuli tegengaat. Ook destabilisatie van actinefilamenten (1 μM cytochalasine-D) verlaagt de gemiddelde snelheid, terwijl stabilisatie (10 μM phalloïdine) het transport versnelt³⁶. Dit wijst erop dat actineuitlopers, of microfilamenten (MF), en microtubuli (MT) de voornaamste cytoskeletsporen zijn waarlangs mitochondriën zich binnen de cel bidirectioneel kunnen verplaatsen^{29, 32, 43}. Oorspronkelijk was er de opvatting dat netto anterograad transport gebeurt langs MT, terwijl netto retrograad transport langs MF gebeurt³². Ook zou volgens deze auteur de gemiddelde snelheid en het nettotransport over MF en MT verschillend zijn en de gemiddelde snelheid over MT significant hoger dan over MF, maar zouden mitochondriën zich minder vaak voortbewegen over MT dan over MF³². Dit zou erop wijzen dat binnen het globaal transportsysteem, transport over MF dient om mitochondriën af te voeren en dat dit dus complementair zou zijn aan het transport over MT. Een recentere studie toont echter aan dat MF eerder een antagonistische rol ten opzichte van transport over MT vervult⁴⁴. Bij depletie van myosine (motorproteïne van MF) is een verhoogde gemiddelde snelheid en meer lange afstandstransport vastgesteld. Mogelijks faciliteren MF ook *docking* van organellen⁴⁴.

De energieafhankelijke motoren kinesine en dyneïne worden gelinkt aan respectievelijk anterograad en retrograad transport over microtubuli²⁹. Zo werd de kinesine motor KIF1B gecolocaliseerd met mitochondriën en is deze *in vitro* in staat mitochondriën te verplaatsen langs MT⁴⁵. Anderzijds zou transport van mitochondriën langs actinefilamenten met behulp van myosine motoren gebeuren²⁹.

Beweging van mitochondriën verloopt niet continu, maar saltatorisch en gaat vaak gepaard met richtingsveranderingen. Deze richtingsveranderingen zou-

den kunnen wijzen op koppeling en ontkoppeling van mitochondriën en transportmoleculen¹⁰. Een andere theorie stelt dat beide types transportmoleculen gelijktijdig vastgekoppeld zitten aan een mitochondrion en kunnen koppelen met of ontkoppelen van het cytoskelet.

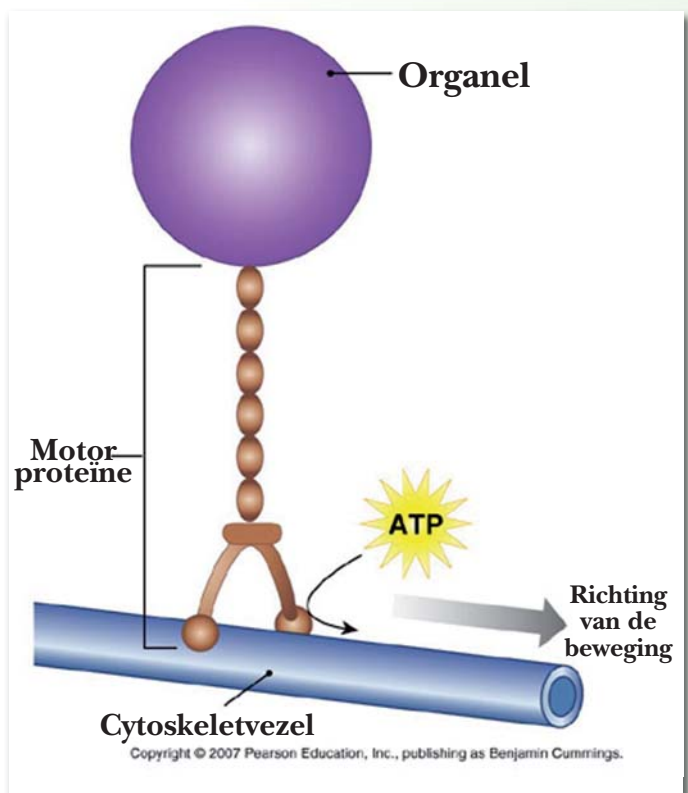
Omdat deze moleculaire motoren niet in staat zijn rechtstreeks te binden aan de mitochondriën, werd er gezocht naar mogelijke adaptorproteïnen als fysieke link tussen vracht en motor. Zo blijken de eiwitten milton en miro noodzakelijk voor anterograad transport in neuronen van *Drosophila melanogaster*^{46, 47}. Milton interageert rechtstreeks met kinesine en miro. Miro is een eiwit in het mitochondriaal buitenmembraan dat GTPase en calciumbindende domeinen heeft. Neuronen waarin milton of miro ontbreken, vertonen gebrekkig mitochondriaal transport en hebben maar weinig mitochondriën bij de axonale uiteinden. Deze defecten leiden tot verminderde synaptische transmissie^{46, 47, 48}. TRAK1 en TRAK2 zijn milton homologen bij zoogdieren^{49, 50}. Het is nog niet zeker dat hun functie volledig identiek is aan die van milton en zich louter beperkt tot het koppelen van miro aan het motoreiwit⁵⁰. Het is mogelijk dat ze ook andere functies hebben.

Samengevat bestaat het transportsysteem uit de vracht (mitochondriën), de sporen (MT, MF), de motorproteïnen (kinesine, dyneïne, myosine) en verschillende adaptereiwitten (milton, miro) (Figuur 2 - 5).

2.2.4 Regulatie van het transport

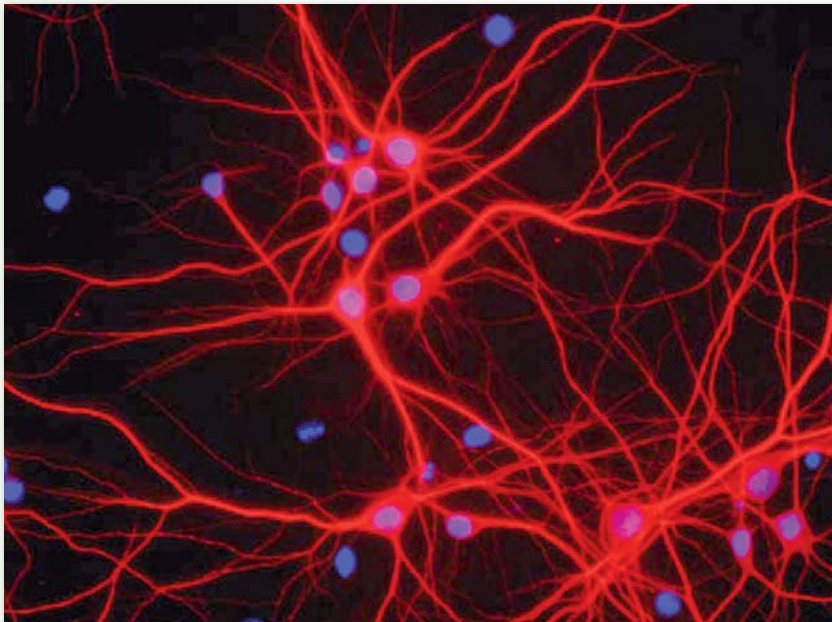
Regulatie via motorproteïnen

Aangezien mitochondriën via motorproteïnen getransporteerd worden, moet het transport direct of indirect geregeld worden via deze proteïnen. Een mogelijkheid is het lokaal wijzigen van de fosforylatietoestand van de motorproteïnen. Kinesine en dyneïne zijn beide fosfoproteïnen^{51, 52, 53, 54, 55, 56}. Hun functie kan beïnvloed worden door



Figuur 2 - 5: Het transportsysteem van de cel. Organellen worden getransporteerd door motorproteïnen over het cytoskelet.

fosforylering van hun aminozuurketens. Er is bewijs dat fosforylatie de activiteit van kinesine en dyneïne kan wijzigen^{52, 54, 55, 56, 57} en dat het de associatie kan reguleren van motorproteïnen en organellen^{51, 58, 59}. De mechanismen die het starten en stoppen regelen, zijn belangrijk bij de verdeling van mitochondriën. Er is echter nog weinig zekerheid over hoe de stationaire toestand van mitochondriën tot stand komt. Toch zijn er associaties beschreven tussen mitochondriën en MT^{60, 61, 62, 63, 64}. Microtubulus geassocieerd eiwitten (MAP) zijn eiwitten die kunnen binden aan de tubuline-eenheden van de microtu-



Figuur 2 - 6: Immunofluorescentie van microtubulus geassocieerd proteïne MAP2 via een MAP2 antilichaam (rood) en celkernen via DAPI (blauw) in neuron en gliacellen.

buli en een belangrijke rol spelen in de stabilisatie ervan (Figuur 2 - 6). Studies hebben aangetoond dat deze specifieke proteïnen van hoog moleculair gewicht (HMW-MAP) het buitenmembraan van de mitochondriën met de MT kunnen verbinden, waarschijnlijk via specifieke bindingsdomeinen op het mitochondrion^{65, 66}. Tau, een axonaal eiwit dat MT stabiliseert, zou dezelfde functie hebben⁶⁷. Het verband tussen metabolische functie en *docking*

van mitochondriën zou erin bestaan dat de bindingsplaats samenvalt met de plaats voor ATP-vrijgave^{68, 69}. Daarnaast zijn er ook aanwijzingen dat de werking van *docking*- en motorproteïnen gekoppeld is⁷⁰.

Regulatie via de membraanpotentiaal

Visualisatie van $\Delta\Psi_m$ met de membraanpotentiaalindicator JC-1 toont aan dat gepolariseerde mitochondriën (JC-1 is rood) anterograde en gedepolariseerde mitochondriën (JC-1 is groen) retrograde getransporteerd worden over een axon³⁴. Deze migratiepatronen suggereren dat actieve mitochondriën getransporteerd worden naar afgelegen plaatsen waar energie nodig is, ter-

wijl minder actieve, mogelijk beschadigde mitochondriën terugkeren naar het cellichaam.

De drijvende kracht voor mitochondriale Ca^{2+} -opname is hoofdzakelijk de mitochondriale membraanpotentiaal. Verhogingen in $[\text{Ca}^{2+}]_m$, gekoppeld aan synaptische activiteit, resulteren in een verlaging van $\Delta\Psi_m$ ^{71, 72, 73, 74}. Ook vrije radicalen en veranderingen in ATP/ADP-verhouding zouden $\Delta\Psi_m$ significant kunnen beïnvloeden tijdens synaptische activiteit. $\Delta\Psi_m$ is een dus belangrijke parameter bij onderzoek naar zenuwaandoeningen.

Regulatie via neuronale en synaptische activiteit

Ondanks de schijnbaar chaotische beweging is er toch gericht transport en *docking*. De locatie van mitochondriën komt overeen met plaatsen in de cel waar veel ATP verbruikt wordt. Het verband tussen ATP-productie van mitochondriën en neuronale activiteit is cruciaal voor het begrip van het complexe fysiologische gedrag van neuronen. Mitochondriën verhuizen bijvoorbeeld naar regio's zoals de groeiconus, pre- en postsynaptische sites^{33, 40, 75}. Deze rekrutering zou gereguleerd worden door neuronale activiteit en men suggereert dat de rekrutering van mitochondriën het gevolg is van de lokale metabolische toestand^{40, 75}. Mitochondriën houden voornamelijk halt daar waar geen andere mitochondriën zijn, wat leidt tot een gelijkmatige axonale verdeling³⁴.

Mitochondriaal transport reageert ook op lokale concentraties *nerve growth factor* (NGF)^{40, 76}. Na activatie (NGF) en inactivatie (cytochalasine E 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) van een groeiconus wordt respectievelijk netto anterograad en retrograad transport vastgesteld^{40, 76}. Hierbij wordt vooral verandering in activiteit van de anterograde motoren vastgesteld terwijl de activiteit van de retrograde motoren ongewijzigd blijft⁴⁰.

Tetrodotoxine (TTX) (1 μM) remt het mitochondriaal transport in neuronen ook af³⁶. TTX bindt met de spanningsafhankelijke natriumkanalen in het neuronale membraan zodat actiepotentialen, waarvoor deze kanalen noodzakelijk zijn, verhinderd worden. FCCP (1 μM) en oligomycine (10 μM) vertragen en verminderen ook het mitochondriaal transport³⁶. FCCP of carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon is een ionofoor dat een H^+ -lek in

het binnenmembraan veroorzaakt en zo de ATP-synthese verstoort. Oligomycine blokkeert F₀/F₁-ATPase.

Een hoge ADP-concentratie zou ook een signaal zijn dat mitochondriën tot stilstand brengt⁷⁷. De ADP over ATP-verhouding zou dan de bepalende parameter zijn. Deze verhouding zou niet zozeer een effect hebben op de moleculaire motoren zelf, die allemaal volledig actief zijn bij ATP-concentraties ver onder de ATP-concentratie in de cel, maar eerder op de adaptormoleculen⁷⁰. Neuraal en mitochondriaal energiemetabolisme vereisen ook communicatie via cellulaire signalen. Veel vragen hieromtrent zijn nog steeds onbeantwoord, maar wellicht speelt de intracellulaire calciumconcentratie hierbij een belangrijke rol.

Regulatie via Ca²⁺

Hoewel chelatie (= onbeschikbaar maken) van extracellulair Ca²⁺ (2 mM EGTA) geen direct effect lijkt te hebben, zou depletie van intracellulaire Ca²⁺ stores of opslagplaatsen (thapsigargine) het transport significant vertragen⁸⁶. Intracellulaire opslag van Ca²⁺ kan dus een belangrijke rol spelen in het mitochondriaal transport. Er is aangetoond dat mitochondriaal transport beïnvloed wordt door Ca²⁺: lokale verhoging van de Ca²⁺-concentratie in het cytosol ([Ca²⁺]_c) stopt het mitochondriaal transport onmiddellijk⁷⁸. Dit kan een mechanisme zijn om energie te leveren daar waar er vraag is: de mitochondriën houden halt waar er een hogere [Ca²⁺]_c is zodat ze meer Ca²⁺ kunnen opnemen⁷⁹. Synaptosomale en somale mitochondriën vertonen een verschillende gevoeligheid voor excessief Ca²⁺. Mitochondriale Ca²⁺-opname regelt de spatiotemporale verdeling van Ca²⁺-signalen in het cytosol en kan dus neuronaal gedrag beïnvloeden^{80, 81}. Een ander gevolg van Ca²⁺-opname is vorming van mitochondriaal ROS dat in verband is gebracht met bepaalde neurodegeneratieve ziekten^{82, 83, 84, 85}.

2.2.5 Neurodegeneratieve aandoeningen

Neuronen hebben een grote hoeveelheid ATP nodig voor het onderhouden van ionengradiënten over de celmembranen en voor neurotransmissie. Maar ook Ca²⁺-buffering door mitochondriën is cruciaal voor neurotransmissie en overleving van de cel. Gebrekkige werking van mitochondriën zal het overle-

ven en functioneren van neuronen dus sterk in gevaar brengen^{86,87}. Mitochondriale dysfunctie werd dan ook verbonden aan neurodegeneratieve aandoeningen als de ziekte van Alzheimer, Parkinson en Charcot-Marie-Tooth¹. Steeds meer onderzoek wijst ook op een rol voor defecten van mitochondriaal transport in de pathogenese van deze aandoeningen^{1,88}.

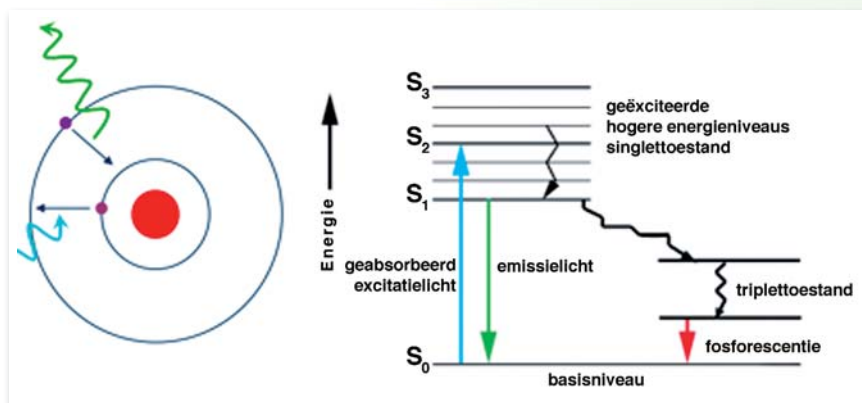
Aggregatie van mitochondriën is een ander fenomeen geobserveerd in zenuwcellen van Charcot-Marie-Tooth patiënten. CMT2A-allelen van het MFN2-gen veroorzaken aggregatie en bijgevolg defecten in neuronaal transport^{89,90}. De relevantie voor pathogenese van de ziekte moet verder onderzocht worden.

Zowel bij de ziekte van Parkinson als bij het verouderingsproces komen gastro-intestinale klachten voor. Deze klachten worden gekoppeld aan neurodegeneratie van het EZS⁹¹.

2.3 Fluorescentie

2.3.1 Microscopie

Bij fluorescentiemicroscopie wordt licht van een specifieke golflengte gefocust op een staal. Het invallend licht exciteert de fluorescente moleculen waarbij die kortstondig een hoger energieniveau bereiken. Bij het terugvallen naar een lager energieniveau zenden ze licht uit van een langere golflengte (Figuur 2 - 7). Dat emissielicht wordt opgevangen door de objectieflens en verder naar het oculair of de camera gestuurd. De kwaliteit, signaal/ruis-verhouding en in het bijzonder de resolutie (tijd en ruimte) van het beeld hangt van verschillende factoren af: concentratie van fluorofoor, laadtijd, golf-



Figuur 2 - 7: Het principe van fluorescentie. Een foton van korte golflengte exciteert een fluorescente molecule. Bij het terugvallen wordt een foton van langere golflengte uitgezonden.

lengte van het licht, numerieke apertuur van de microscoop lens, snelheid van de camera, enz.

Het excitatielicht kan ofwel gefilterd worden uit een lichtbron ofwel afkomstig zijn van een laser. Het gebruik van filters heeft het voordeel dat er gemakkelijk van golflengte kan veranderd worden. Een laser heeft een hoger vermogen en produceert quasimonochroom licht (zeer nauwe bandbreedte), maar is duurder en weinig flexibel, daar voor elke golflengte een andere laser nodig is.

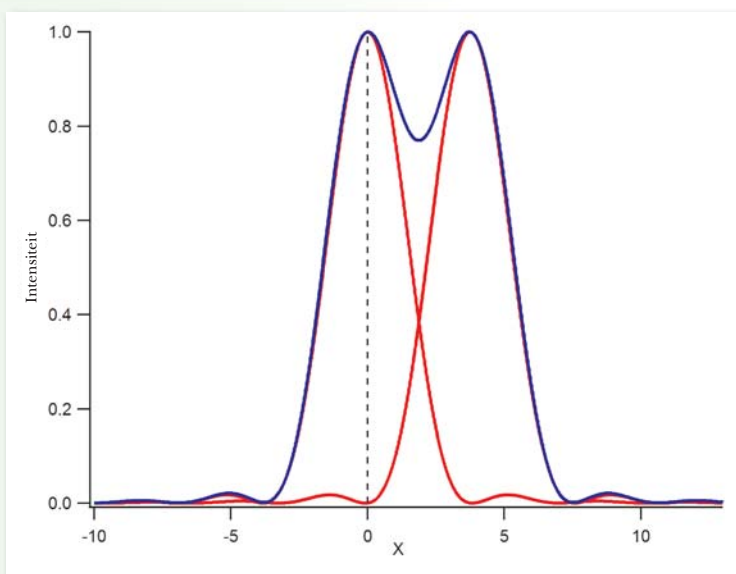
De resolutie die men kan bekomen met lichtmicroscopie is beperkt vanwege diffractie. De intensiteit van licht uitgezonden door één punt van het staal is niet één scherpe piek, maar een diffractiepatroon dat bestaat uit verschillende lokale maxima die afnemen naarmate de afstand van het punt groter wordt. Dit patroon wordt ook wel *airy disk* genoemd of *pointspread function*. De wiskundige vorm is gebaseerd op de Besselfunctie van de eerste soort:

$$I(\theta) = I_0 \left(\frac{2J_1(x)}{x} \right)^2, \text{ met } x = k a \sin \theta$$

waarbij I_0 de maximum intensiteit in het centrum is, J_1 de Besselfunctie van de eerste soort van de eerste orde, $k = 2\pi/\lambda$ het golfgetal, a de straal van de

apertuur en θ de observatiehoek. De essentie van het begrip resolutie is het onderscheiden van twee punten. Het Rayleigh criterium geeft ons, vertrekkend van de *pointspread functions*, een grens wanneer twee punten nog net te onderscheiden zijn (Figuur 2 - 8):

“Twee punten kunnen nog net onderscheiden worden wanneer het maximum van de eerste PSF samenvalt met het eerste minimum van de tweede PSF. Komen ze dichterdan zijn ze niet meer te onderscheiden als



Figuur 2 - 8: Het Rayleigh criterium bepaalt wanneer twee punten nog net te onderscheiden zijn aan de hand van hun PSF.

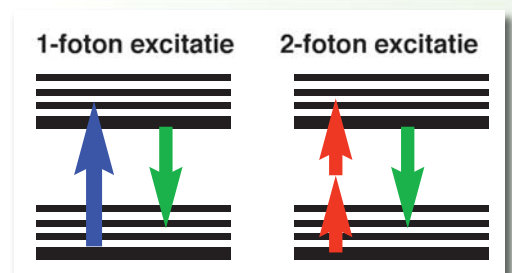
twee verschillende punten. Gaan ze verder uit elkaar dan zijn ze wel te onderscheiden als twee verschillende punten. ”

Gegeven de formule voor de resolutie (wet van Ernest Abbe)

$$D_{min} = 0,612 \frac{\lambda}{NA}$$

met λ de golflengte van het gebruikte licht, NA de numerieke apertuur van het objectief en D_{min} de minimale afstand tussen twee punten die nog te onderscheiden zijn, is onmiddellijk duidelijk dat D_{min} beperkt is. Wanneer we deze formule evalueren voor een hoge apertuur van 1,4 en een korte golflengte van licht in het zichtbaar spectrum 450 nm (blauw licht) dan komen we op een resolutie van 197 nm. Dit is ongeveer de ondergrens van de optische resolutie opgelegd door diffractie. Deze ondergrens wordt als absoluut beschouwd zolang men binnen het zichtbaar spectrum werkt. Tegenwoordig zijn er echter technieken die toelaten voorbij deze grens te gaan en dus een betere resolutie te bekomen: hiervoor wordt de nanoscopie gebruikt.

Om de resolutie in de z-richting te verbeteren en optische secties te maken wordt de techniek van de confocaliteit toegepast. Bij confocale fluorescentie-microscopie wordt het opgevangen licht beperkt door het gebruik van een schijf met een beperkte opening. Het licht dat uit focus is, wordt zo tegengehouden en er blijft een scherpe focale spot over waarmee in één vlak wordt gescand. Een 3D-reconstructie kan bekomen worden door het samenvoegen van deze vlakken opgenomen over de z-richting. Een alternatief voor de optisch-mechanische confocaliteit is twee-foton excitatie. Twee-foton microscopie resulteert in een betere focus van het excitatielicht omdat twee fotonen in plaats van een worden gebruikt om te exciteren (Figuur 2 - 9). Deze fotonen hebben het dubbel van de golflengte van het gebruikelijke één-fotonexcitatielicht. Ze worden in femtosecon-



Figuur 2 - 9: Het principe van twee-foton fluorescentie. Excitatie gebeurt met twee quasi simultane fotonen met halve energie van het foton van één-foton fluorescentie.

den na elkaar gepulst door een laser. Enkel die moleculen die beide fotonen quasi simultaan ontvangen zullen fluoresceren. Aangezien langere golflengtes dieper doordringen, kan er dieper in het monster binnengedrongen worden. Het signaal is echter ook minder sterk omdat er minder licht opgevangen wordt en bovendien is het twee-fotonsysteem duur omwille van de gepulste laser. Hoewel veel biologische processen relatief traag verlopen is het van belang snel genoeg beelden te capteren. Klassiek kunnen er een tiental beelden per seconde worden opgenomen, maar de tijds resolutie kan verbeterd worden door gevoelige kHz camera's die een paar duizend beelden per seconde capteren. Dit is veel meer dan het menselijk oog dat ongeveer 25 beelden per seconde onderscheidt.

2.3.2 Beeldvorming van levende cellen

Fluorescentiemicroscopie is een van de weinige opties wanneer men levende cellen wil visualiseren. Het staal kan zowel een celcultuur als weefsel zijn dat geladen is met fluorescente moleculen. De kleuring, de aard van het excitatielicht, de temperatuur en gebruikte buffers moeten echter toelaten dat de cellen in leven blijven tijdens het experiment. Hun levensduur is in elk geval beperkt omwille van fototoxiciteit ten gevolge van fotobleaching. Fotobleaching is het verschijnsel waarbij de fluoroforen vernietigd worden door te veel licht (overexcitatie) waardoor reactieve zuurstof radicalen gevormd worden die eiwitten oxideren. Dit veroorzaakt zowel verlies aan signaal als sterfte van de cellen.

2.3.3 Mitochondriale markers

Zowel synthetische moleculen als eiwitten kunnen als fluoroforen gebruikt worden. De meeste fluoroforen zijn typisch vlakke moleculen met geconjugeerde π -systemen. Fluorescente eiwitten gebruikt in beeldvorming, worden genetisch tot expressie gebracht. Het DNA met de genen voor fluorescente markers kan rechtstreeks in de cellen ingebracht worden: men spreekt dan van transfecties. Anderzijds zijn er ook transgene muizen, waarin de genen om de specifieke fluorescente markers tot expressie te brengen constitutief aanwezig zijn.

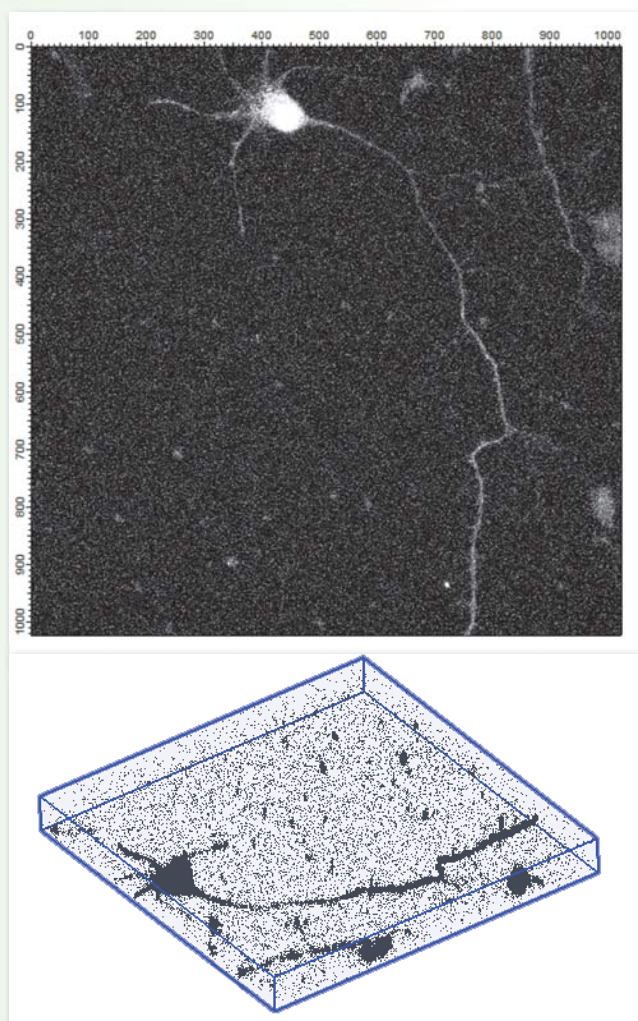
Er zijn heel veel verschillende fluoroforen beschikbaar in alle kleuren van het zichtbaar spectrum. Het is aangeraden een rationele keuze te maken daar niet elk fluorofoor even geschikt is voor een bepaald experiment. Een goed fluorofoor moet specifiek zijn voor een bepaald organel en mag niet te vlug fotobleachen. Sommige fluoroforen dienen om te lokaliseren (*MitoTracker*), andere geven fysiologische toestanden weer zoals de mitochondriale potentiaal (TMRE, zie later). Bij de keuze moet nauwkeurig rekening worden gehouden met absorptie- en emissiespectra van deze fluoroforen. Zo weinig mogelijk overlap is vooral noodzakelijk bij *multicolor*-experimenten. Verder zijn korte emissiegolflengten beter voor de resolutie.

Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) is een fluorofoor dat specifiek is voor mitochondriën en dat dient als indicator voor $\Delta\Psi_m$. Het is een fluorescent lipofiel kation dat snel en reversibel accumuleert in mitochondriën van levende cellen dankzij de negatieve $\Delta\Psi_m$ van de mitochondriën ten opzichte van het cytosol. Wanneer het mitochondrion depolariseert, is er verlies van TMRE uit het mitochondrion en dus vermindert de fluorescentie-intensiteit. De Nernstvergelijking beschrijft de verdeling van inwendige en uitwendige TMRE-concentraties⁹².

Spontane depolarisaties van de mitochondriale membraanpotentiaal worden vastgesteld maar deze zijn reversibel en leiden niet tot permanente depolarisatie. De grootte van de potentiaal varieert van minder dan 10 mV tot meer dan 100 mV met een gemiddelde van $17,6 \pm 1,0$ mV ($n = 360$). Het polariseren en depolariseren gebeurt bij bijna alle mitochondriën en onafhankelijk van elkaar⁹². Om veranderingen in $\Delta\Psi_m$ waar te nemen kan ook rodhamine 123 gebruikt worden dat accumuleert in de mitochondriale matrix.⁹³

Een andere belangrijke groep fluoroforen die accumuleren in mitochondriën zijn de *MitoTracker*-kleurstoffen. *MitoTracker Green FM*® en *MitoTracker Red FM*® (*Invitrogen Molecular Probes*, Leiden, Nederland) kleuren mitochondriën respectievelijk groen en rood (emissielicht). De voorkeur gaat eerder naar *MitoTracker Green* omdat groen een iets betere resolutie zal bieden dan rood zoals blijkt uit de wet van Abbe. *MitoTracker*-moleculen bevatten chloromethylgroepen die covalent binden met vrije sulfhydrylgroepen in de mitochondriën. De kleur in de naam verwijst naar het emissiespectrum van de molecule. *MitoTracker*

Orange en *red* zijn positief geladen rosaminederivaten die snel opgenomen worden in de negatief geladen mitochondriën. Dit wijst er op dat het laden $\Delta\Psi_m$ -afhankelijkheid zou zijn. *MitoTracker Green* zou echter $\Delta\Psi_m$ ongevoelig zijn en in staat zijn geladen te worden en te verblijven in gedepolariseerde mitochondriën. *MitoTracker Green* lijkt ook beter geschikt voor neuronen daar geen verminderd laden vastgesteld wordt wanneer FCCP wordt toegevoegd. Toch wordt ook aan de $\Delta\Psi_m$ -ongevoeligheid van *MitoTracker Green* als echte massamerkers getwijfeld omdat de accumulatie in mitochondriën gebaseerd is op een positieve lading aangetrokken door het negatief geladen inwendig mitochondriaal milieu⁹⁴. De hoge specificiteit ervan voor mitochondriën wordt echter niet in vraag gesteld.^{94,95}



Figuur 2 - 10: 2D en 3D beeldinformatie van een corticale neuron opgenomen met confocale fluorescentie microscopie.

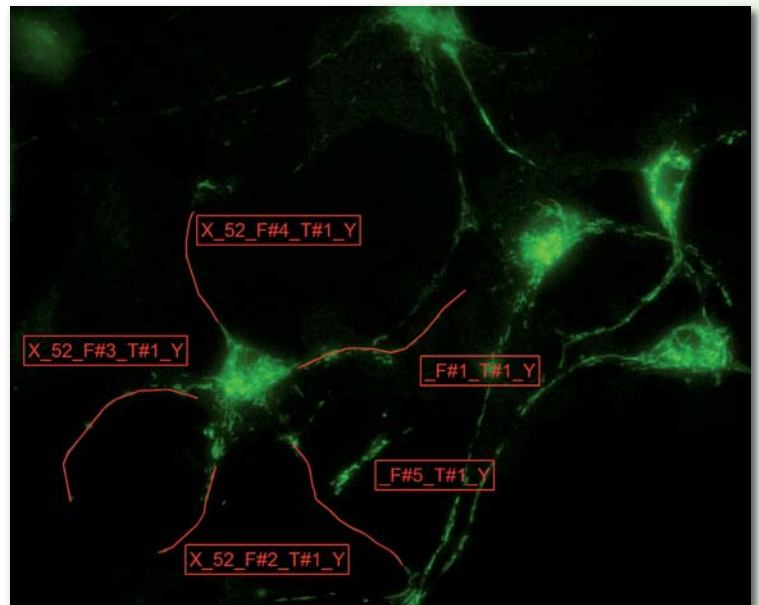
2.4 Beeldanalyse

De verwerking en analyse van beelden is heel belangrijk voor het snel bekomen van relevante informatie bij onderzoek met fluorescentie-microscopie en in het bijzonder voor deze studie. De ruwe beelddata worden opgenomen door de camera op de microscoop, waarna deze worden geïmporteerd in *stand-alone* software. Met deze software gebeurt de beeldverwerking en analyse. De opgenomen beelden kunnen 2D of 3D (3D of 2D+tijd) zijn en in de toekomst mogelijk 4D (3D+tijd)^{96, 97, 98, 99}. 2D is typisch een vlak beeld: een xy-vlak samengesteld uit vlakke pixels (mengwoord: picture+element). 3D kan een ruimtelijk beeld zijn opgebouwd uit voxels (mengwoord: volume + pixel) (Figuur 2 - 10). Een typisch voorbeeld hiervan is een opname met een *scanning* confocale fluorescentiemicroscoop. Deze microscoop scant (zoals eerder vermeld) in het xy-vlak en focust daarna op een hoger of lager gelegen vlak in

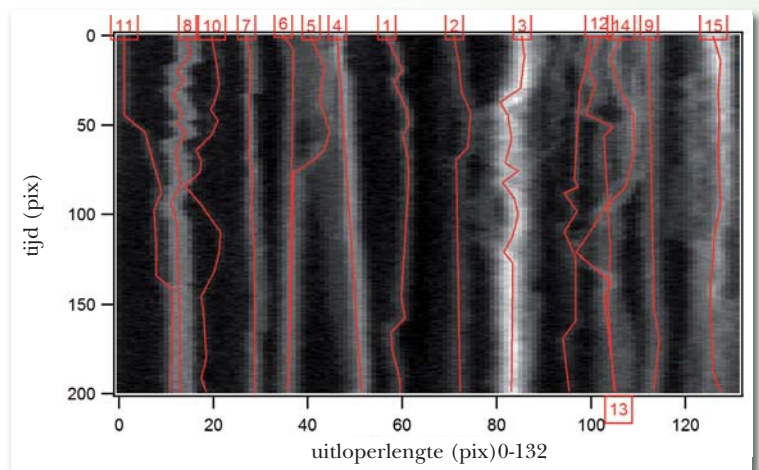
het monster om zo het 3D-beeld op te bouwen als een stapel van vlakken. Een andere vorm van 3D-data is x, y en t-data waarbij t de tijd is: xy-vlakken worden opgenomen in de tijd. Dit is een video-opname. Dit laatste datatype is het meest geschikt om het mitochondriaal transport te onderzoeken indien geen modern 4D-systeem voor handen is. De beeldverwerking en -analyse is het meest technische aspect bij dit soort onderzoek en is heel belangrijk voor de eindresultaten en mag bijgevolg niet verwaarloosd worden. Het verbeteren, implementeren en testen van beeldverwerkingprocedures is een deel van de wetenschap dat veel impact heeft op dit onderzoeksdomein.

De analyse van mitochondriaal transport gebeurt in drie fasen. In een eerste fase worden de uitlopers van de cellen aangeduid in de opgenomen beelden (Figuur 2 - 11). Voor elke aangeduide uitloper wordt automatisch een tijd/ruimte-kaart gecreëerd (Figuur 2 - 12) die informatie over het transport bevat voor elk mitochondrion in de uitloper. In de tweede fase worden de sporen in deze kaarten, die de beweging van de mitochondriën weergeven, aangeduid. Als laatste stap worden voor elk spoor/mitochondrion de waarden van een set transportparameters uitgerekend.

Voor een uitgebreide beschrijving van deze analyse zie 4.2.3. Het handmatig aanduiden van de zenuwuitlopers en sporen is echter een tijdrovende bezigheid. Automatiseren van dit proces



Figuur 2 - 11: Voorbeeld van een opname waarin uitlopers aangeduid werden.



Figuur 2 - 12: Voorbeeld van een tijd/ruimte-kaart die de informatie van het mitochondriaal transport bevat. De sporen worden aangeduid voor analyse van het transport.

maakt hoog-doorvoer-*screening* van neuronen mogelijk. Automatische neuronodetectie implementeren is echter geen triviale opgave. Twijfel bestaat of dit proces volledig kan geautomatiseerd worden zonder verlies aan juistheid. Semi-automatische methoden hebben zonder twijfel hun nut om de snelheid te verhogen met gedeeltelijk behoud van de menselijke interpretatie en dus juistheid van de selectie wanneer dit zou ontbreken in een automatisch systeem. De mogelijkheden voor algoritmes worden enkel begrensd door de creativiteit van de ontwikkelaar. Niet alle methoden zullen echter een goed resultaat geven. De evaluatie van het resultaat is dus de beste maatstaf om een algoritme te evalueren. Verschillende wiskundige methoden kunnen worden gecombineerd om een skelet te bekomen van gegeven neuronale netwerken. Ruisfilters kunnen gebruikt worden om de beelden van ruis te ontdoen. Bijvoorbeeld een Gaussfilter of een discrete versie ervan die computationeel sneller zal zijn. Rasters kunnen gebruikt worden om start- en eindpunten te selecteren in het beeld en iteratieve methoden om het spoor ertussen te detecteren¹⁰⁰. Typische problemen bij de detectie zijn ruis en discontinuïteiten in het beeld van de zenuwuitloper. Ruis is de verzameling van alle ongewenste storingen in het opgemeten signaal. Het bemoeilijkt de automatische selectie van de neuronen. De interesse in een efficiënt en algemeen algoritme neemt steeds toe¹⁰¹. Dankzij de vorderingen van hardware en software zijn er tal van mogelijkheden om data te manipuleren. Dit kan met steeds meer data en aan hogere snelheid. (Men kan een stapel beelden van een confocale opname bijvoorbeeld samenstellen tot een vlak beeld van hogere kwaliteit dan wat een *widefield* microscoop zou opleveren. Wanneer geen confocaal systeem ter beschikking is om een hogere resolutie te bekomen, kan deconvolutie gebruikt worden op beelddata van *widefield* microscopie⁹⁶.) Afhankelijk van het doel kan 3D-data, xyt of xyz, samengesteld worden (geprojecteerd) in een xy-beeld waarbij over de derde dimensie bijvoorbeeld het maximum of het gemiddelde genomen wordt.

3. Doelstellingen

Zoals blijkt uit de inleiding en literatuurstudie is er nood aan een verdere karakterisatie van mitochondriaal transport en verklaring van de controle van dit transport. Binnen dit ruime kader worden twee concrete experimenten uitgevoerd die antwoorden moeten bieden op specifieke deelvragen binnen deze ruime biologische vraagstelling. De eerste doelstellingen zijn dan ook van biologische aard:

- 1) Beschrijven van het mitochondriaal transport in verschillende celtypes in een nieuw cultuurmodel van muis enterische neuronen.
- 2) Zoeken van een verband tussen de mitochondriale membraanpotentialaal en het mitochondriaal transport.

Een volgende doelstelling is eerder technisch van aard:

- 3) Optimaliseren van de computeranalyse van mitochondriaal transport door creatie van een software *tool* die semi-automatische aanduiding van uitlopers en sporen mogelijk maakt.

Deze optimalisatie gebeurt met het oog op nauwkeurige, objectieve aanduiding met tijdsinstaat voor de gebruiker. Het moet toelaten dat verschillende onderzoekers hun projecten efficiënter kunnen uitvoeren.

4. Beschrijving van mitochondriaal transport

4.1 Inleiding

Dit hoofdstuk bespreekt voornamelijk de *MitoTracker Green*-experimenten met als hoofddoelstelling het beschrijven van het mitochondriaal transport in nieuw ontwikkelde celculturen van enterische neuronen. Eerst werden celculturen na 4 tot 7 dagen opgroeien, geladen met *MitoTracker Green*-kleuring waarvan video-opnames gemaakt werden met een fluorescentiemicroscop. Met het softwarepakket Igor werden de uitlopers van de cellen aangeduid. Van deze aanduidingen werden automatisch tijd/ruimte-kaarten getekend die de transportdata van de individuele mitochondriën in de uitloper bevatten. Door aanduiding van de sporen in de tijd/ruimte-kaarten werden deze data geëxtraheerd, waarna deze data van verschillende transportparameters van alle mitochondriën binnen één celtype werden samengebracht en uitgezet in histogrammen en spreidingsdiagrammen. Er werden vier categorieën van transportgedrag gedefinieerd: stationair, oscillerend, anterograad en retrograad. Met behulp van de bekomen data werd het transport per celtype in deze categorieën onderverdeeld en gekwantificeerd. Er wordt geconcludeerd dat in deze culturen meer transportactiviteit plaats vindt in celtype B (vermoedelijk fibroblasten) dan in neuronen, maar dat het transport in neuronen efficiënter georganiseerd is. Er blijkt ook een grotere gelijkenis tussen het transport in neuronen en gliacellen dan celtype B. Verder werden in neuronen veel stationaire mitochondriën vastgesteld die over de hele uitloper verspreid zijn. Het hoofdstuk beschrijft eerst de materialen en methoden die gebruikt werden, daarna volgen de resultaten en de discussie waarin de moeilijkheden, de methoden om deze moeilijkheden te vermijden en de relevantie van de bevindingen besproken worden. Na deze bespreking volgt de conclusie uit deze resultaten. Het hoofdstuk wordt afgesloten met duiding van enkele specifieke transportfenomenen.

4.2 Materiaal en methoden

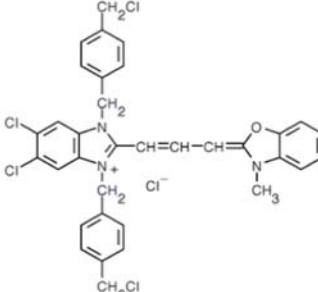
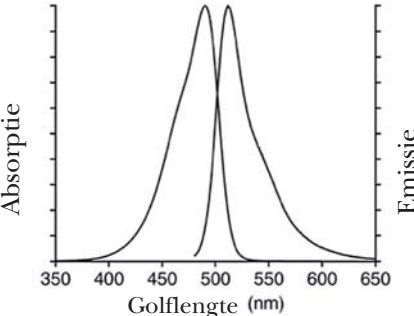
4.2.1 Celculturen

Voor deze experimenten werden primaire celculturen van myenterische

neuronen gebruikt uit de dunne darm (meer specifiek het ileum) van de muis. Volwassen muizen tussen een en drie maand oud werden geëuthanaseerd door cervicale dislocatie. Longitudinale spier-myenterische plexus preparaten werden geïsoleerd uit het ileum van deze muizen. Na digestie van het weefsel in een protease/collagenase ($1 \text{ mg.ml}^{-1} / 1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$) oplossing (20 min, 37°C) volgde een centrifugatiestap (500 g), waarna de pellets opnieuw in suspensie werden gebracht. Vervolgens werden de cellen uitgeplaat op ronde dekglazen in *complete* cultuurmedium (DMEM-12 verrijkt met 50 U/ml penicilline, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycine, 2 mM glutamine en 10 % *foetal bovine serum* (FBS)). Na 24 uur werd dit medium vervangen door serumvrij *mouse* medium verrijkt met neuronale groeifactoren (DMEM-12 verrijkt met 50 U/ml penicilline, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycine, 2 mM glutamine, 0,1 % N-2 supplement, 0,1 % G5 supplement en 50 ng/ml 7-s *Nerve Growth Factor* (NGF)) De primaire celculturen werden 4 tot 7 dagen bewaard op 37°C (5 % CO_2) en het medium werd om de twee dagen vervangen.

4.2.2 Beeldvorming

De cellen werden gedurende 30 minuten geïncubeerd met 75 nM *MitoTracker Green* FM (Figuur 4 - 1; Invitrogen Molecular Probes, Merelbeke, België) in *mouse* medium op 37°C . Daarna volgde een wasstap voor het verwijderen van overtollige kleurstof, waarbij de celculturen overgebracht werden in cultuurmedium zonder *MitoTracker Green* voor 20 min op 37°C . Hierna werden de celculturen in HEPES-oplossing (in mM: 148 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 10 Glucose, 10 HEPES, 2 CaCl_2 , pH aangepast met NaOH tot 7,4) overgebracht om de toniciteit van de cellen te garanderen tijdens de microscopieopnames. Fotobleaching werd zoveel mogelijk vermeden tussen het laden van *MitoTracker Green* en de opname. Voor de beeldvorming werd een Zeiss Axiovert 200M microscoop (Carl Zeiss, Oberkochen, Duitsland) met TILL Poly V lichtbron (TILL Photonics, Grafelfing, Duitsland) gebruikt. De metingen werden uitgevoerd bij een temperatuur van 37°C geleverd door een warmte-element aangesloten op de perfusie. De stalen werden geëxciteerd met 475 nm blauw licht en groen emissielicht van 525 nm (Figuur 4 - 2) werd geregistreerd met een gekoelde CCD camera (PCO Sensicam-QE, Kelheim, Duitsland) en TillVISION software (TILLPhotonics) met een opnamesnelheid van 1 beeld (640 x 512 pixels) per seconde.

Merk	MITOTRACKER®
Excitatie/Emissie	blauw (475 nm)/groen (525 nm)
Platform	fluorescentie microscoop
Detectie methode	fluorescentie
Subcellulaire locatie	mitochondriën
Brutoformule	C ₃₄ H ₂₈ Cl ₅ N ₃ O
Moleculaire massa	671,8797 g/mol
CAS naam, nummer	Benzoxazolium, 2-[3-[5,6-dichloro-1,3-bis[[4-(chloromethyl)phenyl]methyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ylidene]-1-propenyl]-3-methyl-, chloride/ 201860-17-5
<p>Figuur 4 - 1: Structuurformule van <i>MitoTracker Green</i>.</p>	
<p>Figuur 4 - 2: Absorptie- en emissiespectrum van <i>MitoTracker Green</i> in methanol.</p>	

4.2.3 Beeldanalyse

De volledige analyse van het mitochondriaal transport werd uitgevoerd gebruikmakend van een pakket procedures ontwikkeld door het *Laboratory for Enteric NeuroScience* dat in dit project uitgebreid werd (zie hoofdstuk 6). De video-opnames van 200 seconden en 640 bij 512 pixels werden geïmporteerd in Igor Pro 6.2 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, VS). Na import kon de intensiteit en het contrast van de beelden aangepast worden, zonder de opgenomen data te veranderen. Dit waren louter visuele hulpmiddelen om de uitlopers en mitochondriën beter te herkennen. Verder beschikt de gebruiker over standaard videocontrole: start, stop, play, loop en keuze van afspeelsnelheid.

De opnames dienden biologisch en beeldtechnisch aan een aantal criteria te

voldoen om bruikbaar te zijn voor analyse. De uitlopers moesten stil liggen en mochten niet migreren. Cellen en uitlopers mochten ook niet te veel over elkaar liggen: plaatsen met een eerder lage celdichtheid droegen de voorkeur weg. Het was noodzakelijk dat de oorsprong van de uitlopers zichtbaar was en dat de cellen gezond waren zodat een zekere populatie mitochondriën zich verplaatste. Tenslotte verhoogde de beeldkwaliteit (contrast, ruis, artefacten, ...) de efficiëntie van de analyse.

Het herkennen en aanduiden van de uitlopers werd vereenvoudigd door de opname van DIC (*differential interference contrast*) beelden en het gebruik van maximumprojecties (Figuur 4 - 3). Hierop wordt dieper ingegaan in 4.4.

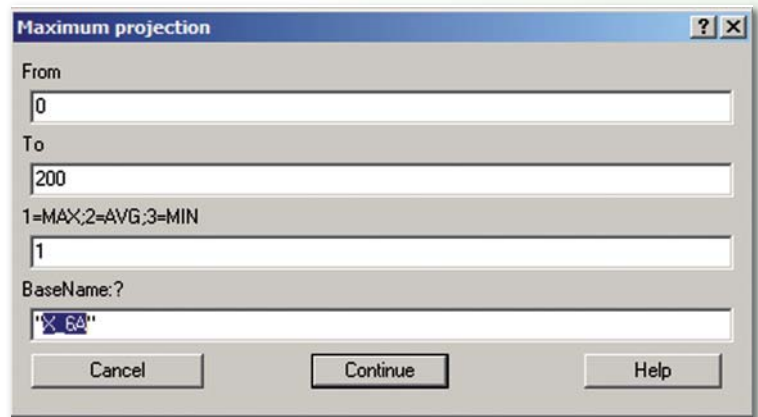
De uitlopers werden handmatig aangeduid door op de beelden punten uit te zetten en te verplaatsen of met de vrije hand met behulp van tekengereedschap. Hierbij werd gestart bij het cellichaam zodat antero- en retrograad transport onderscheiden kon worden. Bij het aanduiden werd het intensiteitsprofiel over het actuele spoor weergegeven als een 1D-functie. Hierdoor kon de intensiteit lokaal gebruikt worden als maatstaf bij de aanduiding.

Daarna werd automatisch een kaart aangemaakt waar op de verticale as de tijd wordt weergegeven en op de horizontale as de booglengte s van het pad over de uitloper (Figuur 4 - 4). Het pad P bestaat uit punten met coördinaten x en y bepaald door een parameter i . Het pad is dan gedefinieerd door zijn parametervergelijking $P(i) = [x(i), y(i)]$. De totale booglengte s wordt bekomen via de definitie

$$s(I_{max}) = \int_0^{I_{max}} \|P'(i)\| di$$

Met als norm de euclidische norm in het vlak:

$$s(I_{max}) = \int_0^{I_{max}} \sqrt{\left(\frac{dx}{di}(i)\right)^2 + \left(\frac{dy}{di}(i)\right)^2} di$$



Figuur 4 - 3: Controlevenster voor het maken van maximumprojecties.

Of discreet als

$$s(I_{max}) = \sum_1^{I_{max}} \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{\Delta i}(i)\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{\Delta i}(i)\right)^2} \Delta i$$

In de analyse bestaan de paden uit aangeduide punten waartussen geïnterpoleerd wordt. De coördinaten x en y van deze punten werden bijgehouden in het standaard Igor datatype: *waves*. De discrete variabele i is dan de index van deze punten waardoor

$$\Delta i = 1$$

de totale booglengte wordt

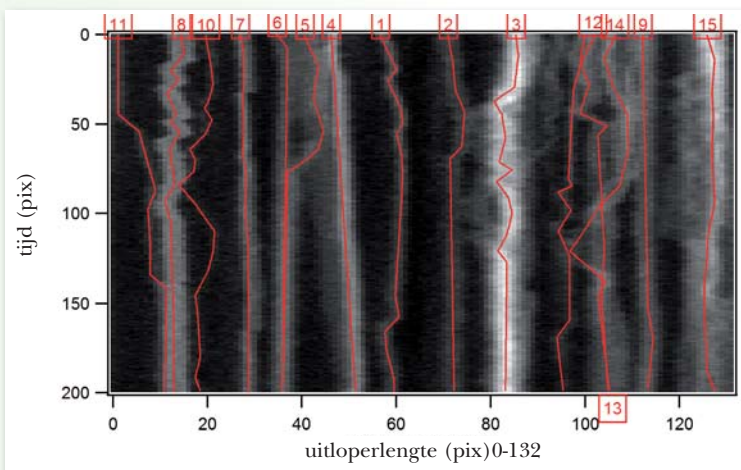
$$s(I_{max}) = \sum_1^{I_{max}} \sqrt{(\Delta x(i))^2 + (\Delta y(i))^2}$$

Bondig te noteren als

$$s(I_{max}) = \sum_1^{I_{max}} d_i \quad (\text{volgens Pythagoras})$$

Waarbij d_i de lengte van de lijnstukken is tussen twee opéénvolgende punten. Zo wordt de booglengte bekomen die op de horizontale as komt van de tijd/ruimte-kaart.

Deze kaart bevat informatie over verschillende eigenschappen van het transport (puntsnelheden, aantal stationairen,...) van de mitochondriën die in de uitloper aanwezig zijn. Op deze kaarten werden met dezelfde aanduidingsmogelijkheden de sporen aangeduid (Figuur 4 - 4). Na het opslaan van de paden wordt voor elk mitochondrion automatisch een lijst gegenereerd met



Figuur 4 - 4: Tijd/ruimte-kaart met gemarkeerde sporen.

parameters die informatie over het transport samenvatten. In de bijlage werden histogrammen van 9 van deze parameters toegevoegd per celtype (bijlage A.6). De voornaamste worden hier besproken.

De span is de booglengte tussen de twee uiterste punten van de afgelegde weg van het mitochondrion. Wanneer de span nul is, is het mitochondrion

niet verplaatst tijdens de opname en is dit mitochondrion dus stationair. De gemiddelde snelheid is het gemiddelde van alle puntsnelheden van een mitochondrion. Wanneer de gemiddelde snelheid negatief is, zal het mitochondrion dus meer retrograad getransporteerd zijn. Voor een positieve gemiddelde snelheid zal deze meer anterograad getransporteerd zijn. De anterograde topsnelheid is het maximum van alle puntsnelheden in anterograde zin van een mitochondrion. Dit is ook zo voor de retrograde topsnelheid maar dan in retrograde zin. De nettoverplaatsing is de booglengte tussen begin- en eindpositie van het mitochondrion. Bij deze parameter geeft een negatief teken retrograde nettoverplaatsing weer.

4.2.4 Dataverwerking en presentatie

Alle video-opnames en transportdata werden ordelijk gerangschikt in mappen en elk mitochondrion kreeg een referentie die het mitochondrion verbindt met de tijd/ruimte-kaart, de uitloper waarin het mitochondrion zich bevindt, de betreffende video-opname en de transportdata. Hiervan werd een overzichtstabel gemaakt om snel de juiste informatie te kunnen opzoeken (bijlage A.1).

De cellen werden morfologisch ingedeeld in drie types die vermoedelijk overeenkomen met gliacellen (type A), fibroblasten (type B) en neuronen (type C) (Tabel 4 - 1). Dit werd later bevestigd door karakterisatie van de muisculturen met behulp van immunofluorescentie. Bij celtype B is er twijfel of het effectief over fibroblasten gaat, daarom worden ze verder type B genoemd.

Type	Vermoedelijke celsoort	Morfologische omschrijving
A	Glia	Driehoekig met drie uitlopers op de hoeken
B	Fibroblast	Rond of veelhoekig met verschillende dikke uitlopers
C	Neuron	Fijne uitlopers, rond/bolvormig cellichaam

Tabel 4 - 1: Drie celtypes morfologisch onderscheiden.

De gegevens van de mitochondriën werden samengebracht in één Igor-document met behulp van de *browse experiment* functie. Om de waarden

van elke parameter snel en eenvoudig te verzamelen over de hele set mitochondriën werd een nieuwe functie *collectData* geschreven (bijlage A.2). Omdat een *wave* het standaard datatype in Igor is, maakt de functie één *wave* per transportparameter (totale reistijd, gemiddelde snelheid, ...) per set mitochondriën van een bepaald celtype.

De functie *collectData* aanvaardt het nummer van de rij waar de te extraheren parameter staat en de naam van de parameter. Daarna wordt het aantal mitochondriën geteld en een *wave* aangemaakt waar alle parameterwaarden in zullen komen. Een luscommando haalt deze data op, waarna de nieuwe *wave* benoemd wordt met de opgegeven naam.

Via de *command-line* werden de data opgehaald van de relevante parameters door toepassen van *collectData*. Daarna werden histogrammen opgesteld voor elk van deze parameters, voor elk van de drie celtypes. Hierbij werden 15 categorieën genomen tussen de minimale en maximale gemeten waarde voor parameters waarvan de waarden steeds positief of steeds negatief zijn en 20 categorieën voor parameters waarvan de waarden zowel positief als negatief kunnen zijn (gemiddelde snelheid, nettoverplaatsing). Voor het aantal richtingsveranderingen is de categoriebreedte 1 genomen.

Dankzij een zelf ontwikkelde functie *makeHistDataRelative* (bijlage A.3) werden alle parameterdata voor de drie celtypes van absolute naar relatieve frequentie overgebracht. De functie aanvaardt het totaal aantal mitochondriën voor het betreffende celtype als argument en maakt daarmee alle data relatief in één bewerking. Via het onderstaande commando werden de relatieve parameterdata, voor bijvoorbeeld 116 mitochondriën, snel bekomen.

makeHistDataRelative(116)

Dankzij het gebruik van macro's konden de histogrammen snel opgeroepen worden en door het kopiëren van macro's konden, mits enkele manuele aanpassingen zoals datainvoer en eenheden, de histogrammen voor alle parameters geproduceerd worden (bijlage A.4).

Voor het bekomen van spreidingsdiagrammen waar stationaire mitochondriën werden uitgezet over de verschillende uitlopers, werden bewegende mitochondriën weggelaten zodat een overzicht verkregen werd van de verde-

ling van stationaire mitochondriën over de uitloper bij uitzetten van de stationaire posities ten opzichte van de uitloperlengte. Zie bijlage A.5 voor een gedetailleerde verklaring van deze werkwijze.

4.3 Resultaten

Verschillende parameters die het mitochondriaal transport beschrijven, werden geëvalueerd voor elk van de drie celtypes. Ze worden hierna simultaan voor de drie celtypes besproken zodat ze onderling als referentie kunnen dienen en zo een maat bieden voor de parameterwaarden per celtype. Er wordt vanuit gegaan dat het in alle celtypes om een universeel transportsysteem gaat. Door het aanduiden van de waargenomen verschillen tussen de celtypes kan echter aangegeven worden welk transportgedrag kenmerkend is voor neuronen waardoor de link gemaakt kan worden tussen het specifieke transportgedrag en de biologische functie van dit celtype. Aangezien in deze thesis de analyse gebeurde op de verschillende celtypes kunnen de andere celtypes dienen als referentie ter beschrijving van het transportgedrag in neuronen, terwijl voor toekomstig onderzoek de hier bekomen informatie over neuronen onafhankelijk kan gebruikt worden als referentie wanneer bijvoorbeeld het transportgedrag beschreven wordt na toediening van farmaca die het transport beïnvloeden. Het aantal geanalyseerde uitlopers en mitochondriën is terug te vinden in onderstaande tabel 4 - 2.

	Aantal uitlopers	Aantal mitochondriën
Type A (glia)	10	116
Type B	14	122
Type C (neuron)	11	161

Tabel 4 - 2: Het aantal geanalyseerde uitlopers en mitochondriën per celtype.

Voor alle uitlopers werd het aantal mitochondriën per 100 micrometer per 100 seconden uitgerekend. Deze waarden worden hieronder weergegeven per uitloper samen met de uitloperlengte, de opnametijd en het aantal mitochondriën (Tabel 4 - 3, 4 - 4 en 4 - 5). De uitloperlengte is de totale booglengte van het aangeduide spoor. Dit is niet steeds gelijk aan de totale fysische lengte van de uitloper omdat de uitloper niet altijd volledig kan aangeduid

worden, maar ook niet altijd in beeld is. Aangezien de fysische lengte niet korter kan zijn, is deze parameter een ondergrens voor de werkelijke lengte van de uitloper.

Type A (glia)

Uitloper ID	Uitloperlengte (μm)	Tijd (s)	Mitochondriën (#)	# . μm^{-1} . s $^{-1}$. 10^4
04112010_7F_1	64,7	200	16	12,36
04112010_7F_2	64,7	200	12	9,27
10112010_16_1	49,8	200	12	12,05
10112010_16_2	47,6	200	10	10,50
10112010_16_3	8,4	200	2	11,90
10112010_22_1	72,2	200	17	11,77
10112010_22_2	64,4	200	22	17,08
10112010_22_4	18,8	200	6	15,96
02122010_15D_1	75,4	200	14	9,28
17122010_B1_1	19,7	200	5	12,69
Gemiddelde	48,6	200	11,6	11,93

Tabel 4 - 3: Uitloperlengte, duur van de opname, aantal mitochondriën en mitochondriale dichtheid voor celtype A.

Type B

Uitloper ID	Uitloperlengte (μm)	Tijd (s)	Mitochondriën (#)	# . μm^{-1} . s $^{-1}$. 10^4
04112010_74_1	51,1	200	6	5,87
10112010_22_3	42,7	200	15	17,56
17112010_13E_1	46,3	200	10	10,80
22112010_52_1	89,3	200	16	8,96
22112010_52_2	29,4	200	5	8,50
22112010_52_3	55,3	200	8	7,23
22112010_52_4	31,4	200	2	3,18
22112010_52_5	59,5	200	18	15,12
22112010_26_1	36,2	200	9	12,43
22112010_A1_1	77,7	200	13	8,37
17122010_9B_1	39,8	200	5	6,28
17122010_127_1	20,1	200	5	12,44
17122010_127_2	15,9	200	3	9,43
17122010_B1_2	31,7	200	7	11,04
Gemiddelde	44,7	200	8,7	9,80

Tabel 4 - 4: Uitloperlengte, duur van de opname, aantal mitochondriën en mitochondriale dichtheid voor celtype B.

Type C (neuron)

Uitloper ID	Uitloperlengte (μm)	Tijd (s)	Mitochondriën (#)	# . μm^{-1} . s $^{-1}$. 10^4
09122010_12D_1	90,6	200	21	11,59
09122010_12D_2	32,4	200	4	6,17
09122010_12D_3	74,4	200	5	3,36
17122010_F5_1	43,4	200	6	6,91
11032011_A3_1	105,5	200	16	7,58
11032011_A3_2	110,7	200	11	4,97
11032011_A3_3	145,3	200	22	7,57
11032011_A3_4	112,3	200	21	9,35
11032011_B4_1	190,0	200	26	6,84
18032011_4F_1	84,8	200	18	10,61
24032011_135_1	37,5	200	11	14,67
Gemiddelde	93,4	200	14,6	8,15

Tabel 4 - 5: Uitloperlengte, duur van de opname, aantal mitochondriën en mitochondriale dichtheid voor celtype C.

Hieruit blijkt dat de gemiddelde uitloperlengte van neuronen meer dan 2 maal langer is dan die van gliacellen en celtype B. De in deze context gehanteerde definitie van uitloperlengte indachtig, kan dit een indicatie zijn dat neuronen het transport anders moeten reguleren om mitochondriën over langere afstanden te positioneren. Ondanks dat voor neuronen het gemiddeld aantal mitochondriën per uitloper (14,6) het hoogst is, is er toch de laagste dichtheid (8,15) omdat de gemiddelde uitloperlengte meer dan 2 maal langer is.

Er werden arbitraire definities vastgelegd voor het onderscheiden van het transportgedrag in vier categorieën namelijk oscillerend, stationair, antero- en retrograad gedrag (Tabel 4 - 6).

Transportgedrag	Definitie
Oscillerend	2 of meer richtingsveranderingen
Stationair	Span = 0
Retrograad	Gemiddelde snelheid < 0
Anterograad	Gemiddelde snelheid > 0

Tabel 4 - 6: Definities voor het transportgedrag.

Op basis van deze definities werd elk van deze vier categorieën gekwantificeerd voor elk van de drie celtypes. Ook werden voor zes parameters de maximale gemeten waarden genoteerd (Tabel 4 - 7).

	Type A (glia)	Type B (fibroblast)	Type C (neuron)
oscillerend (%)	25,00	40,16	9,32
stationair (%)	37,07	17,21	72,67
retrograad (%)	32,76	35,25	9,32
anterograad (%)	21,55	41,80	13,66
Max. topsnelheid ant. ($\mu\text{m/s}$)	0,62	0,38	0,24
Max. topsnelheid retro. ($\mu\text{m/s}$)	-0,32	-0,49	-0,32
Max. span (μm)	9,63	11,61	5,83
Max. totale reistijd (s)	189	199	124
Max. nettoverplaatsing antero (μm)	9,28	11,61	3,94
Max. nettoverplaatsing retro (μm)	-8,76	-6,79	-5,83

Tabel 4 - 7: Kwantificering van het transport.

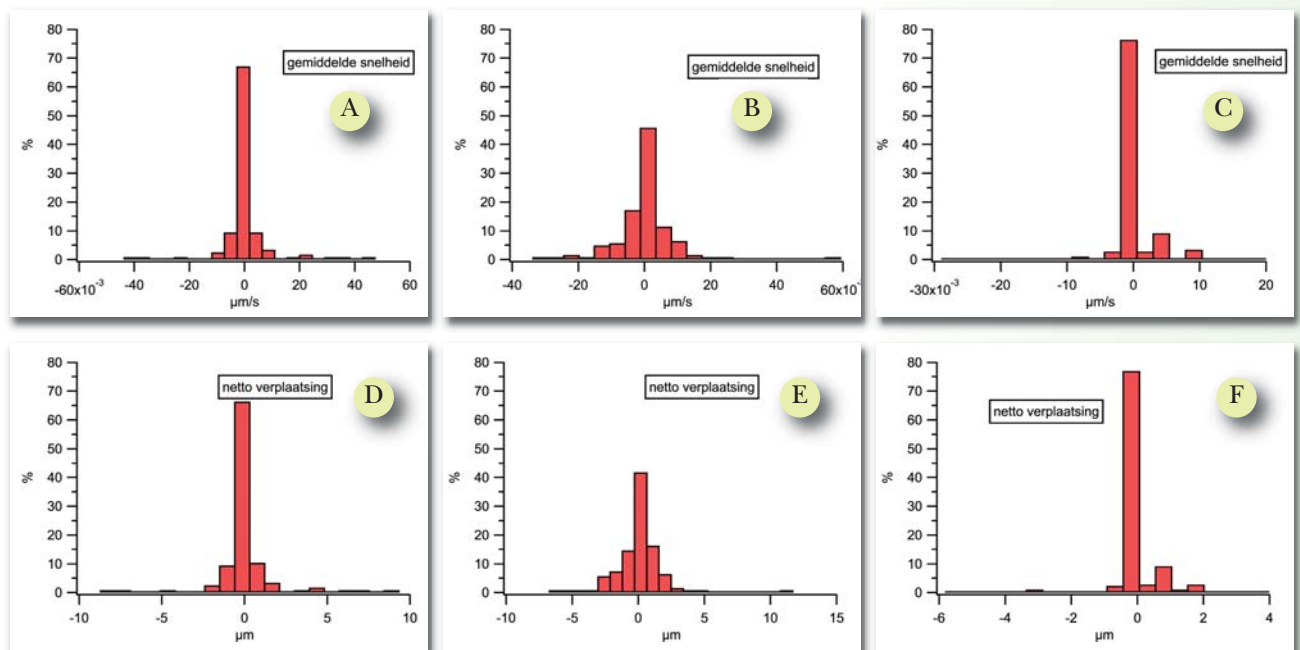
Uit de topsnelheden van alle mitochondriën werd hier de maximumwaarde geselecteerd. Ook werd het maximum en het minimum van de nettoverplaatsing geselecteerd dat respectievelijk overeenkomt met de maximum gemeten nettoverplaatsing in anterograde zin en de maximum gemeten nettoverplaatsing in retrograde zin.

De significantie van alle onderstaande vergelijkingen werd bevestigd door een χ^2 -test met significantieniveau van 5 %.

Een groot deel van de neuronale mitochondriën is stationair (72,67 %). Dit is beduidend meer dan het aantal stationaire mitochondriën van gliacellen (37,07 %) dat zich situeert zich tussen dat van neuronen (72,67 %) en type B (17,21 %). Neuronen bezitten ook weinig oscillerende mitochondriën (9,32 %), terwijl gliacellen er meer bezitten (25,00 %) en type B nog meer (40,16 %). Bij gliacellen is meer retrograad (32,76 %) dan anterograad transport (21,55 %) van mitochondriën. Neuronen hebben echter algemeen veel minder retro-

graad en anterograad transport (22,98 %) dan glia (54,31 %) en type B (77,05 %). Op gebied van anterograad transport zijn neuronen (13,66 %) en glia (21,55 %) vergelijkbaar, maar type B (41,80 %) steekt er bovenuit. Voor neuronale mitochondriën is de maximale span (5,83 μm versus 11,61 μm en 9,63 μm) duidelijk lager, net zoals de maximale totale reistijd (124 s versus 199 s en 189 s) en de maximale nettoverplaatsing anterograad (3,93 μm versus 11,61 μm en 9,28 μm). De maximale nettoverplaatsing retrograad is echter vergelijkbaar tussen de drie celtypen.

Deze resultaten blijken ook uit de histogrammen die voor 9 transportparameters opgesteld werden (bijlage A.6). Uit Kolmogorov-Smirnovtesten blijkt dat geen enkele van de verdelingen van deze parameters normaal verdeeld is, zelfs niet wanneer stationaire mitochondriën niet meegerekend worden (significantieniveau 5 %). Verder zijn de gemiddelde waarden heel laag en de medianen vaak nul door de vele stationaire mitochondriën, daarom werden in tabel 4 - 7 maximumwaarden aangegeven. De belangrijkste histogrammen en spreidingsdiagrammen worden hier afgebeeld.

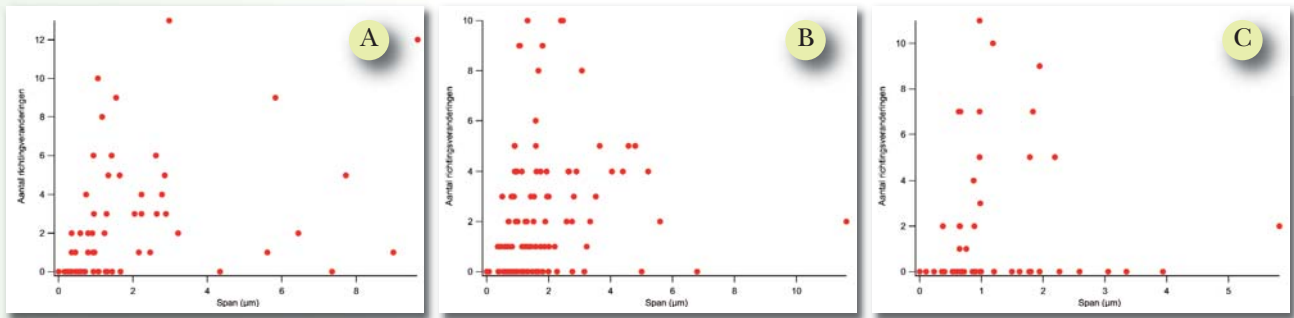


Figuur 4 - 5: Gemiddelde snelheid (A,B,C) en nettoverplaatsing (D,E,F) per celtype: respectievelijk type A, B en C.

Deze histogrammen bevestigen het feit dat er bij neuronen een merkkelijk hoger aantal stationaire of quasi-stationaire mitochondriën zijn en dat er

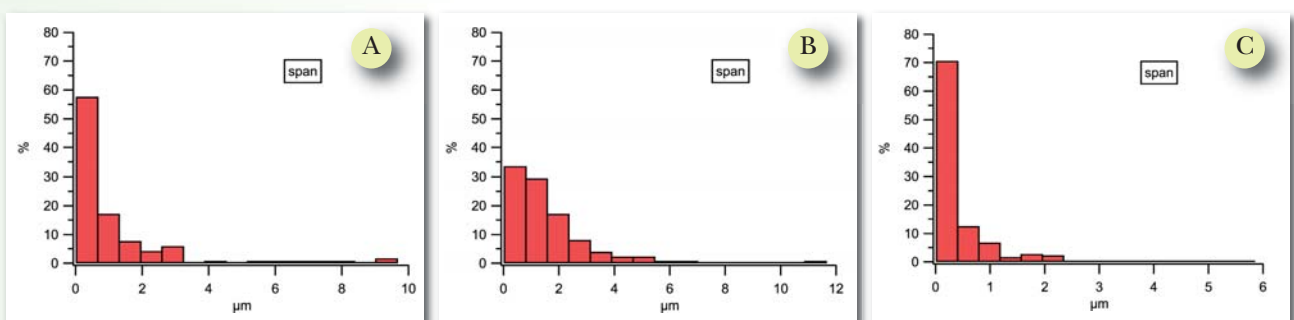
algemeen meer transport is waargenomen bij type B (Figuur 4 - 5). Deze trends volgen uit alle opgestelde histogrammen van de 9 transportparameters.

Uit volgende spreidingsdiagrammen blijkt ook het beperkt aantal oscillerende mitochondriën bij neuronen in vergelijking met de andere celtypes (Figuur 4 - 6).



Figuur 4 - 6: Aantal richtingsveranderingen versus de span per celtype: respectievelijk type A, B en C.

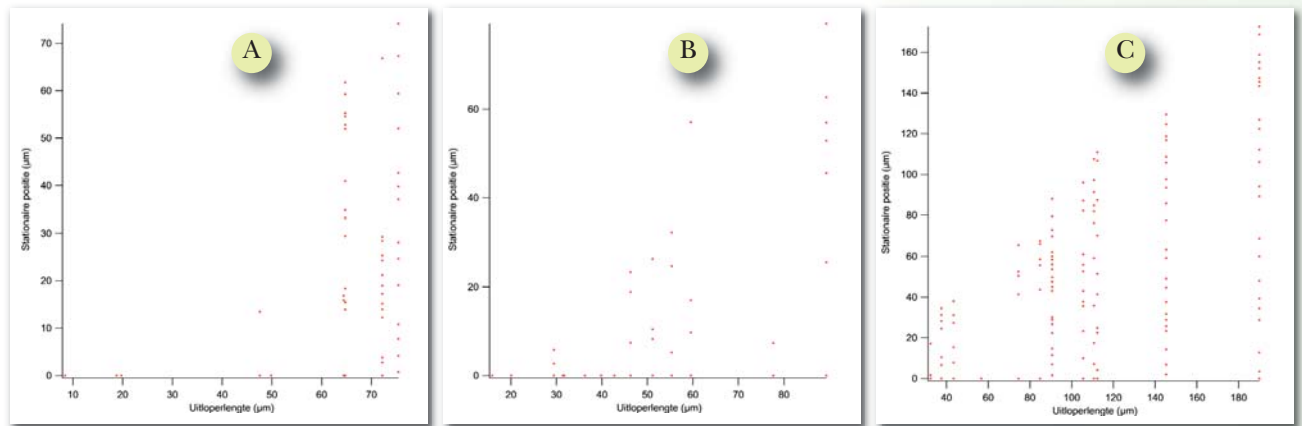
Een opmerkelijke vaststelling is dat de meeste neuronale mitochondriën die zich verplaatst hebben, geen richtingsverandering ondergaan. De spreiding van de span van deze mitochondriën is ook groter. Toch is de gemiddelde span van alle neuronale mitochondriën duidelijk korter dan die van alle mitochondriën van celtype B en gliacellen zoals blijkt uit onderstaande histogrammen (Figuur 4 - 7).



Figuur 4 - 7: Verdeling van de span van mitochondriën per celtype: respectievelijk type A, B en C.

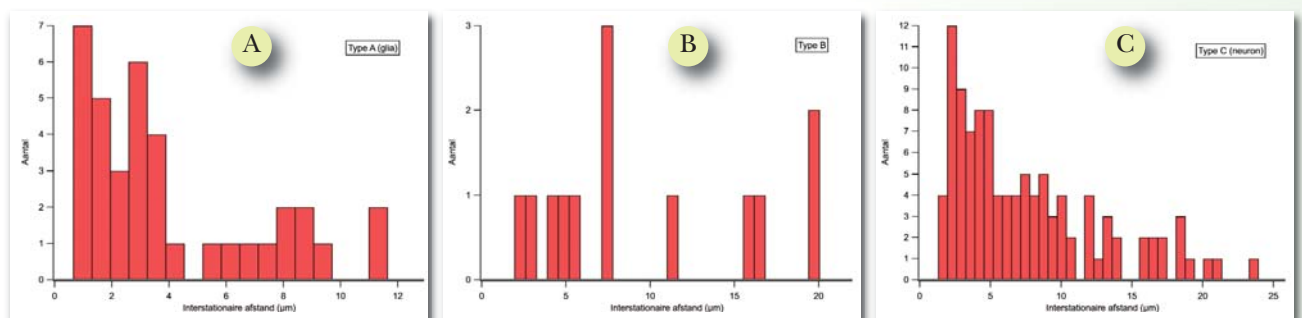
De spreidingsdiagrammen van Figuur 4 - 8 zijn ontwikkeld om een zicht te krijgen op de verdeling van stationaire mitochondriën over de verschillende uitlopers. De methode die speciaal werd ontwikkeld om tot deze voorstelling te komen, werd neergeschreven onder 4.2.4 en de gebruikte code in bijlage

A.5. In deze diagrammen wordt elk bewegend mitochondrion, zelfs al is de beweging minimaal, weggelaten. Door uitzetten van de positie van de mitochondriën tegenover de uitloperlengte worden de uitlopers als het ware op rechte lijnen naast elkaar gelegd van kort naar lang (Figuur 4 - 8).



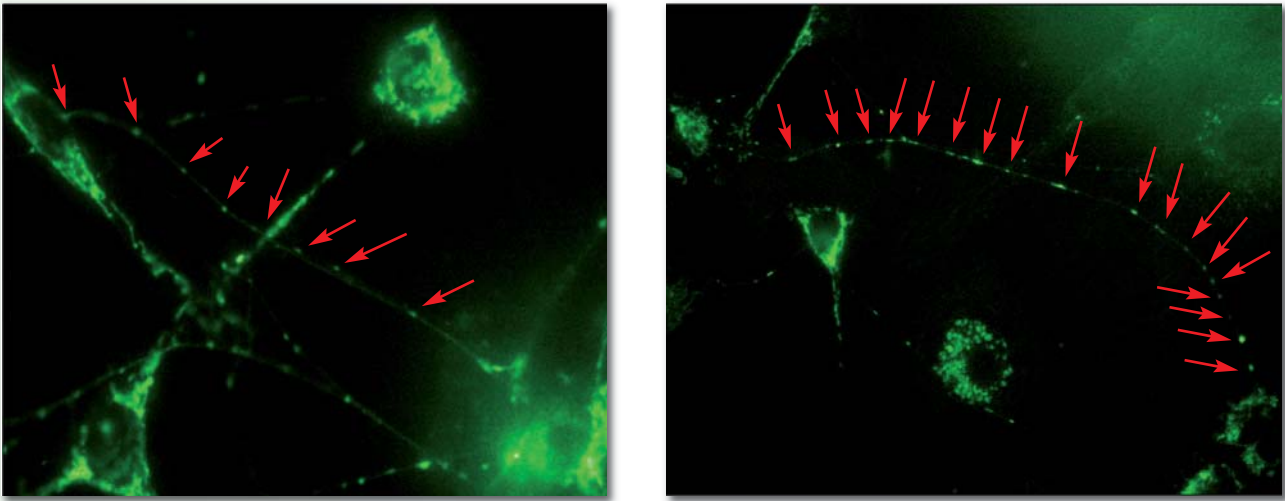
Figuur 4 - 8: Stationaire posities versus uitloperlengte per celtype: respectievelijk type A, B en C.

Neuronale uitlopers bezitten duidelijk meer stationaire mitochondriën die gelijkmatiger over de hele uitloper verspreid zitten. De interstationaire afstanden werden uitgezet in onderstaande histogrammen (Figuur 4 - 9). Bij neuronen vinden we het grootste aantal gelijke afstanden met een piek rond 3,5 μm . De klassenbreedte van deze histogrammen werd bepaald volgens het Nyquistcriterium ($2 \times \text{pixelgrootte}$) en is 0,646 μm .



Figuur 4 - 9: Verdeling van de interstationaire afstanden per celtype: respectievelijk type A, B en C.

De grote gelijkmatigheid kon ook rechtstreeks in de opnames van neuronen vastgesteld worden (Figuur 4 - 10).



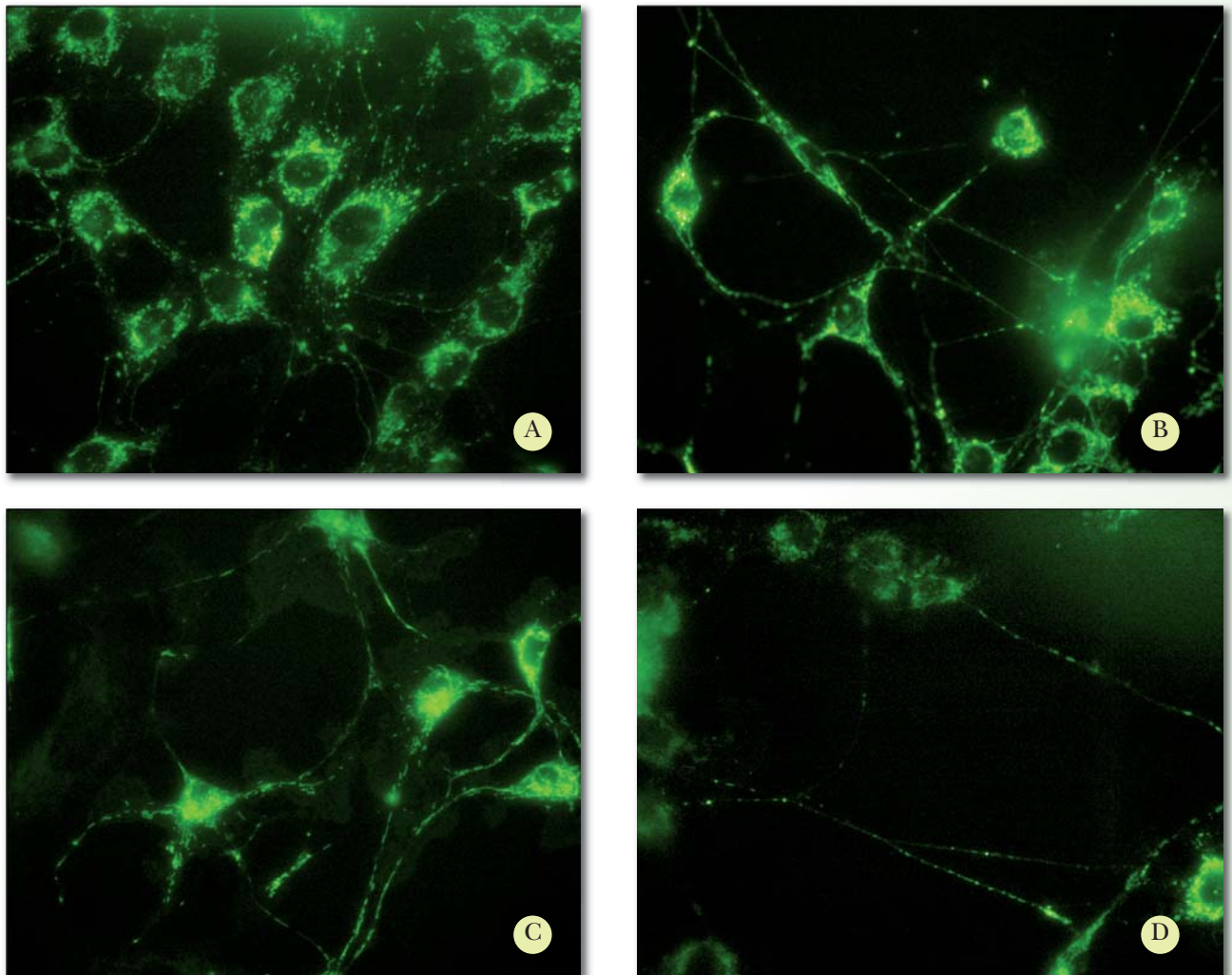
Figuur 4 - 10: *MitoTracker Green*names tonen de gelijkmatig verdeelde stationaire mitochondriën in neuronuitlopers.

Uit deze data blijkt dat in deze muisculturen met enterische neuronen meer transportactiviteit plaats vindt in celtype B maar dat transport in neuronen efficiënter is aangezien minder oscillerende mitochondriën en meer ‘rechtstreeks’ transport (mitochondriën zonder richtingsveranderingen en een beduidende span) waargenomen is. Ook bewegen de neuronale mitochondriën minder ver en minder lang en was er in gliacellen meer retrograad dan anterograad transport. Uit de meeste parameters blijkt ook een grotere gelijkenis tussen transport in glia en neuronen. Verder werden in neuronen veel stationaire mitochondriën vastgesteld met een gelijkmatige verdeling over de uitloper.

4.4 Discussie

4.4.1 Moeilijkheden bij de analyse

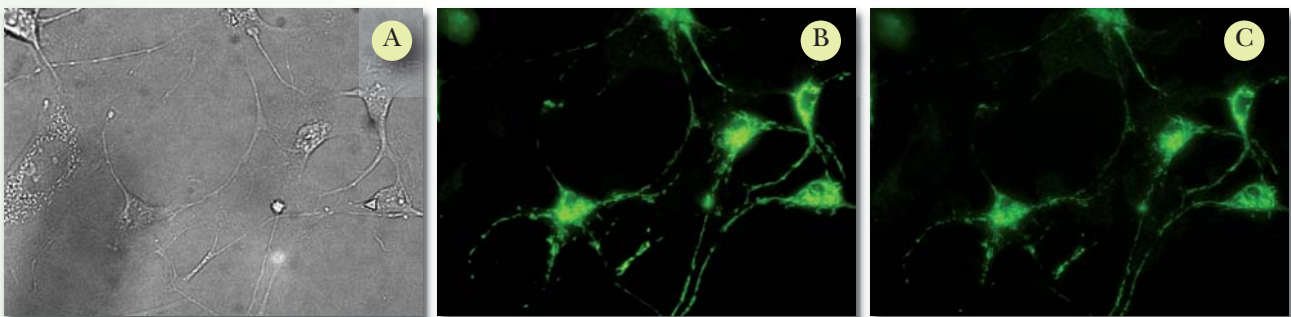
Waar het celmateriaal werd gedeponerd bij het bereiden van de celculturen werden initieel vaak grote clusters cellen geobserveerd waarin heel moeilijk uitlopers terug te vinden waren (Figuur 4 - 11A). Voor de karakterisatie van het transport werd dan eerder aan de buitenkant van deze clusters gefilmd waar de dichtheid aan cellen lager was en de uitlopers duidelijker onderscheiden konden worden (Figuur 4 - 11 B,C,D). Naarmate de nieuwe celculturen evolueerden, stelde dit probleem zich minder.



Figuur 4 - 11: *MitoTracker Green*opnames; A. Een te hoge dichtheid aan cellen bemoeilijkt de analyse in uitlopers. B,C,D Bij een lage dichtheid zijn de uitlopers en de bijhorende mitochondriën beter analyseerbaar.

Aangezien de *MitoTracker*kleuring alle mitochondriën in alle celtypes kleurt, zijn er verschillende factoren die de analyse bemoeilijken. De registratie van een cellulaire uitloper kan gehinderd worden door andere cellen die er bovenop of onder liggen. Het cellichaam van een uitloper kan buiten het bereik van de camera vallen waardoor anterograad en retrograad niet kan onderscheiden worden. Aangezien *MitoTracker* alleen mitochondriën kleurt is het niet altijd duidelijk waar de uitloper loopt. Om deze moeilijkheden te verhelpen werden twee verschillende technieken toegepast. Tijdens de opnames werd steeds een DIC-beeld opgenomen van dezelfde *field of view* als de fluorescentieopnames (Figuur 4 - 12A) waarop dankzij de differentiële interferentie de structuren van cellen en uitlopers beter zichtbaar zijn in tegenstel-

ling tot de fluorescentieopnames (Figuur 4 - 12C) waarbij enkel de mitochondriën een indicatie bieden voor de positie van de uitlopers. Als tweede hulpmiddel bij de herkenning en aanduiding werden regelmatig met de software Igor Pro maximumprojecties (Figuur 4 - 12B) gemaakt van de fluorescentieopnames. Daarbij wordt voor elke pixel in de video de maximumwaarde genomen over de tijd waardoor de afgelegde weg van een mitochondrion zichtbaar gemaakt kon worden als een spoor in deze maximumprojectie. De DIC-beelden en maximumprojecties werden dan over de fluorescentiebeelden gelegd (bijlage A.7) zodat een aangeduide uitloper op de DIC- en maximumbeelden kon behouden worden in de fluorescentiebeelden. Eventueel werd van deze beelden het contrast aangepast voor een nog beter zicht op de uitlopers.

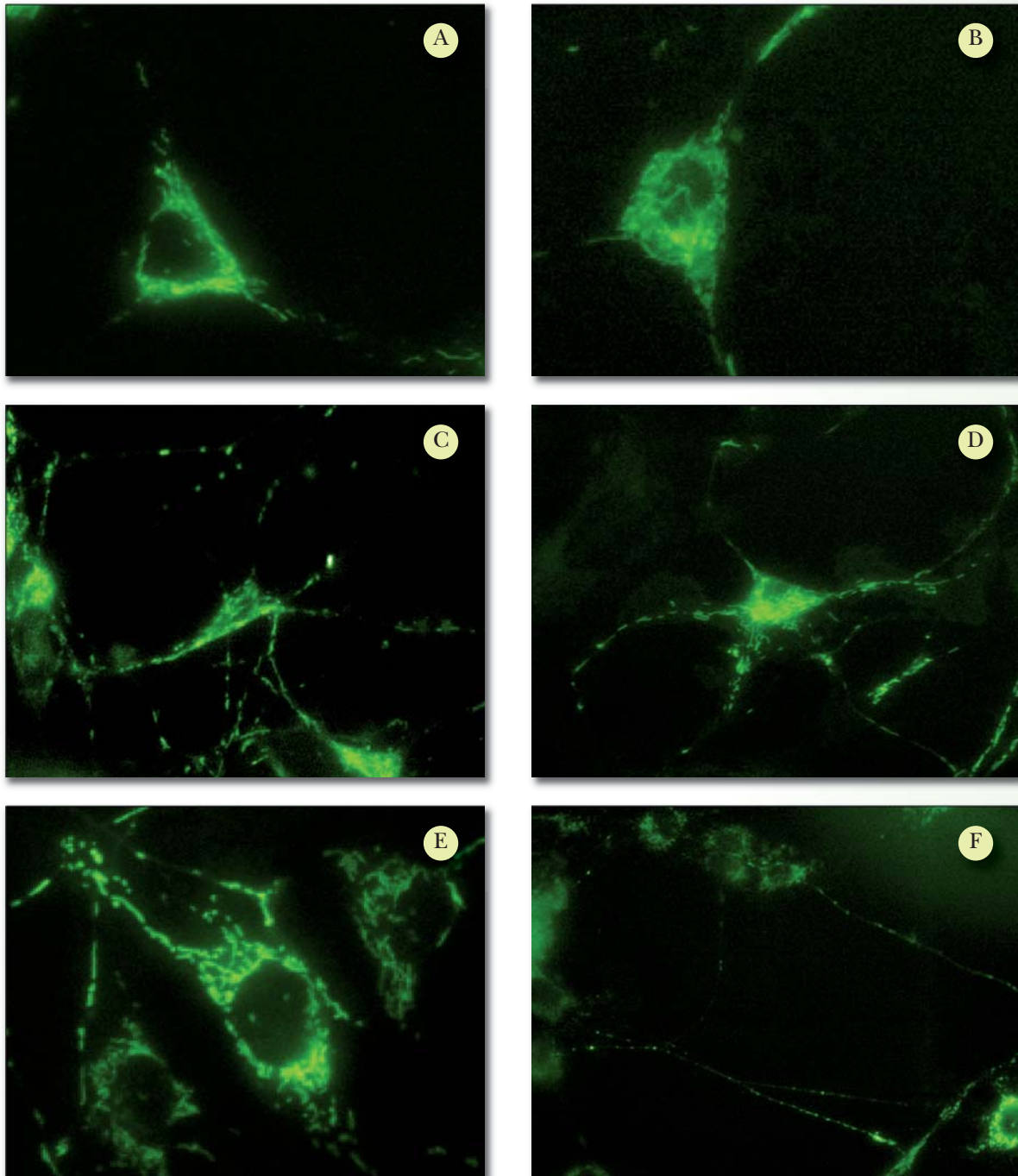


Figuur 4 - 12: Technieken om uitlopers te analyseren; A. DIC opname. B. Maximumprojectie C. Fluorescentie-opname.

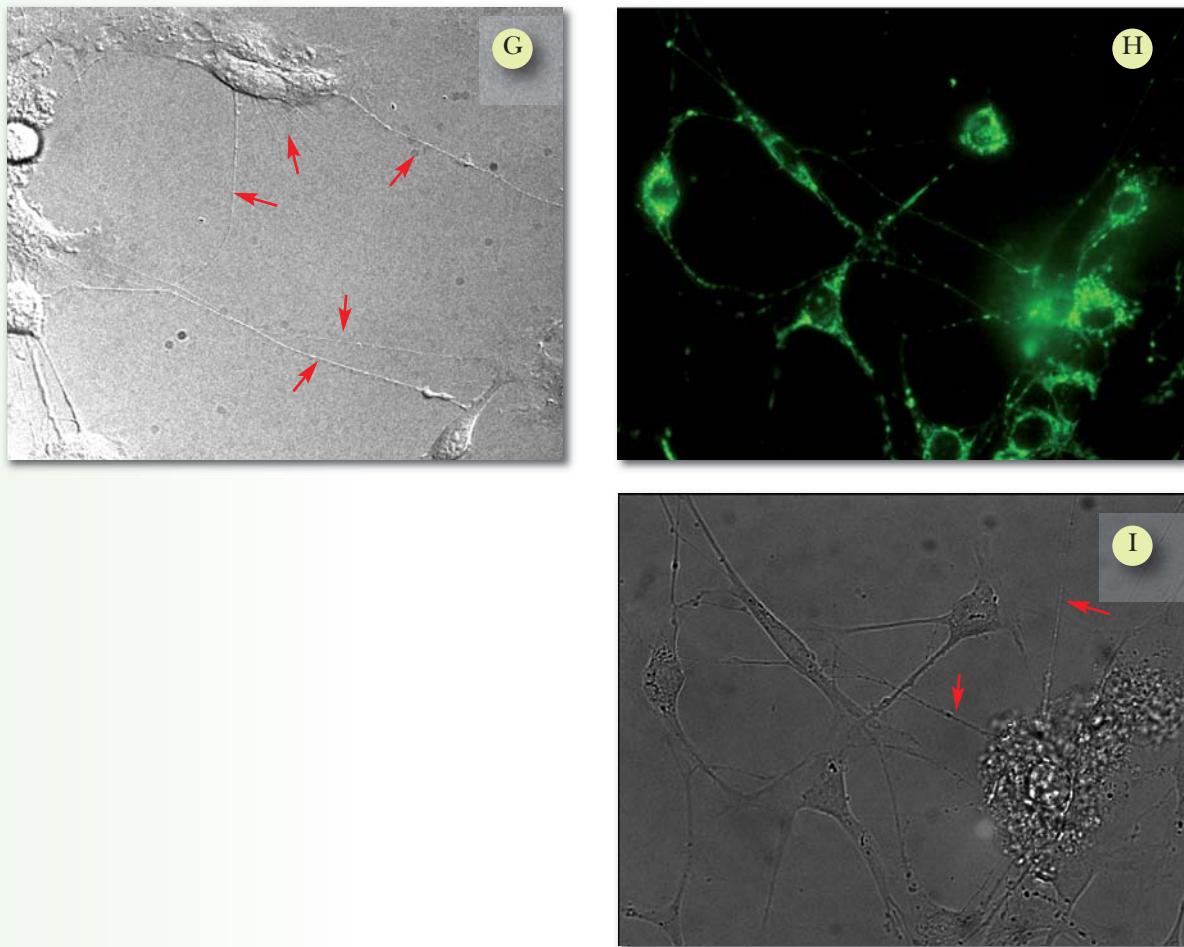
De uitlopers kunnen ook gaan bewegen tijdens de video-opnames onder invloed van celmigratie of druk van de perfusie. Dit is niet gewenst voor de analyse omdat het aangeduide pad dan niet meer de werkelijke positie van de uitloper weergeeft doorheen de tijd. Bij de analyse werden dergelijke uitlopers vermeden. Indien de uitloperverplaatsing niet te groot is en loodrecht op de uitloperrichting gebeurt, kan de parameter 'breedte' iets groter genomen worden zodat het gemiddelde, dat wordt genomen loodrecht op de uitloper, iets verder buiten de uitloper reikt zodat mitochondriën toch nog op te sporen zijn over het hele tijdsdomein van de opname.

Bij de aanvang van dit project werd door de betrokken onderzoeksgroep LENS overgestapt op een nieuw diermodel namelijk muis, waar vroeger cavia

gebruikt werd. De nieuwe celculturen moesten simultaan met dit project ontwikkeld worden en de verschillende celtypes aanwezig in de culturen moesten gekarakteriseerd worden. Daarom werd voor deze thesis gewerkt met een onderverdeling in drie celtypes op basis van morfologie. De celtypes en hun omschrijving kunnen worden teruggevonden in tabel 4 - 1. Hieronder zijn enkele typevoorbeelden afgebeeld (Figuur 4 - 13).



Figuur 4 - 13: Drie celtypes werden morfologisch onderscheiden; Type A (glia): driehoekig met uitlopers op de hoeken (A,B,C); Type B: veelhoekig met verschillende uitlopers (D,E); Type C (neuron): fijne uitlopers met bolvormig cellichaam (F,H).



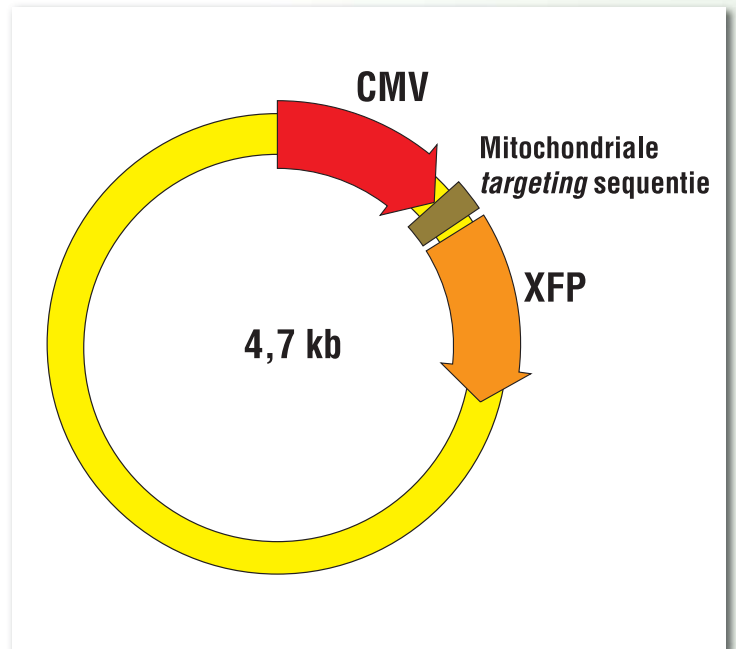
Figuur 4 - 13: Drie celtypes werden morfologisch onderscheiden; Type C (neuron): fijne uitlopers met bolvormig cellichaam (F,H); DIC-beelden tonen de fijne uitlopers (G,I).

4.4.2 Transfecties

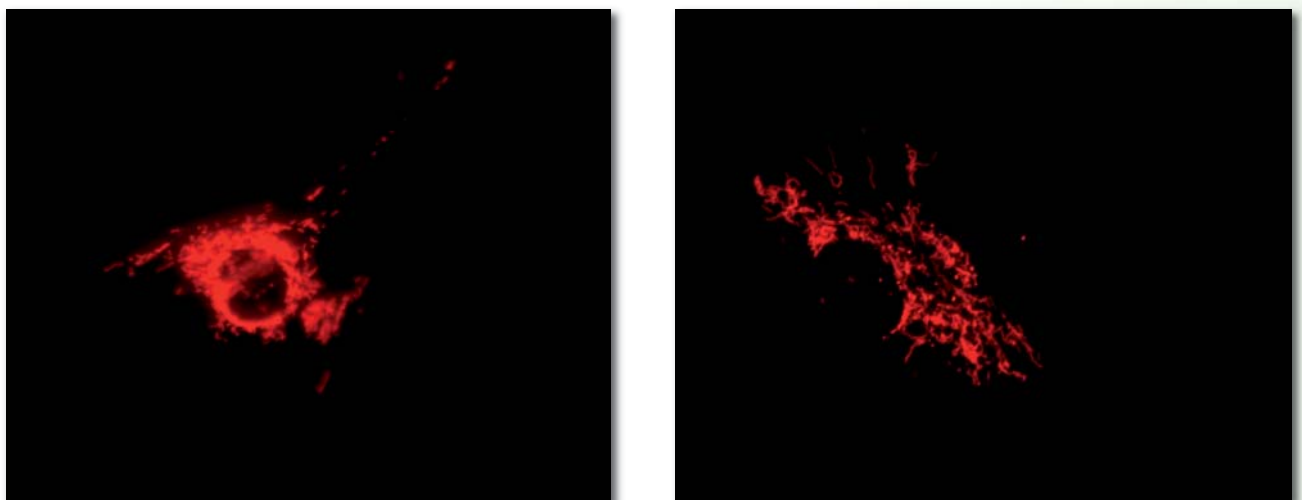
Een aantal experimentele transfecties werden uitgevoerd met het oog op vereenvoudiging van de analyse van het mitochondriaal transport. Zoals blijkt uit 4.4.1 is het identificeren van het celtype en cellichaam dat bij een bepaalde uitloper hoort niet vanzelfsprekend. Het gebruik van transfecties zou de identificatie van het celtype, evenals de identificatie van het cellichaam dat bij een uitloper hoort, sterk kunnen vereenvoudigen. Ook zijn de tijd/ruimte-kaarten van betere kwaliteit aangezien het gebruik van fluorescente proteïnen achtergrondsignalen vrijwel uitsluiten en er minder ruis aanwezig is. Een nadeel is dat bij een lage transfectie-efficiëntie meer experimenten moeten gedaan worden om een zelfde hoeveelheid effectieve data te verkrijgen. Om

de beste efficiëntie te bekomen, werden verschillende transfectiemethoden uitgetest. De uitgevoerde transfecties worden kort beschreven en het principe ervan wordt uitgelegd. Daaruit wordt een conclusie getrokken over de toepasbaarheid van deze transfecties binnen de gegeven context van mitochondriaal transport in uitlopers.

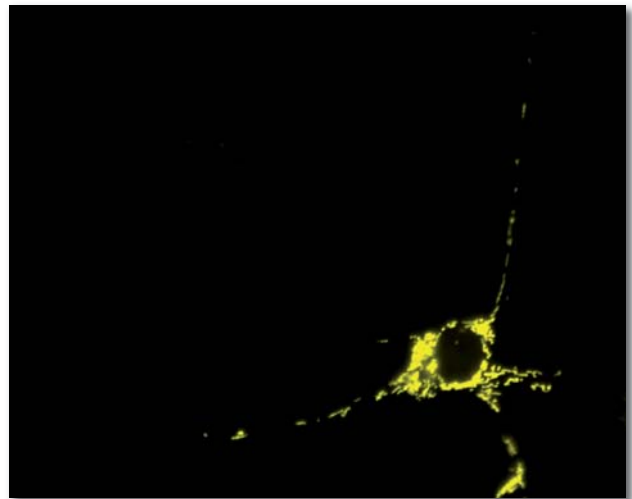
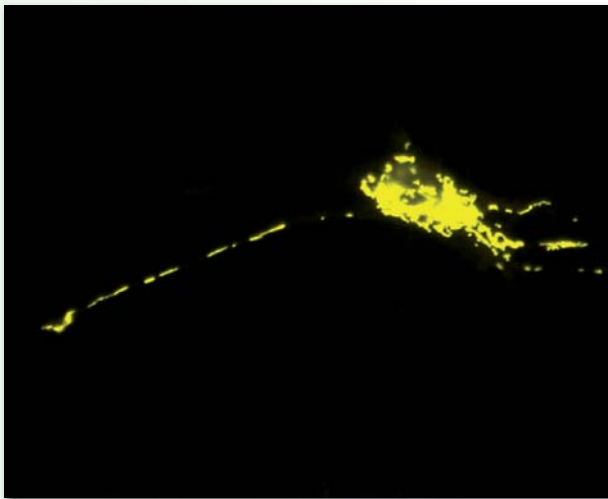
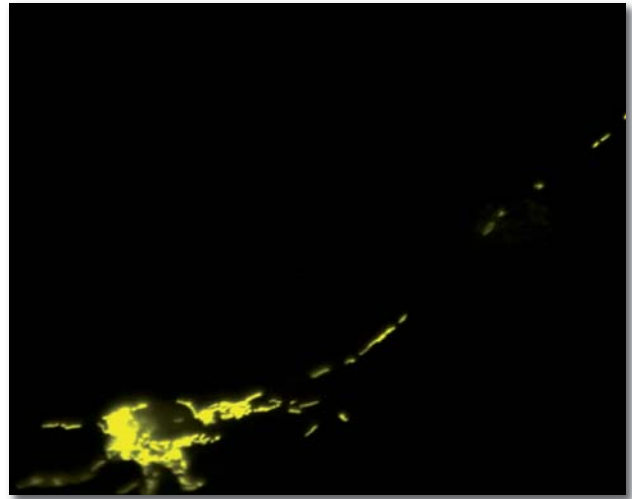
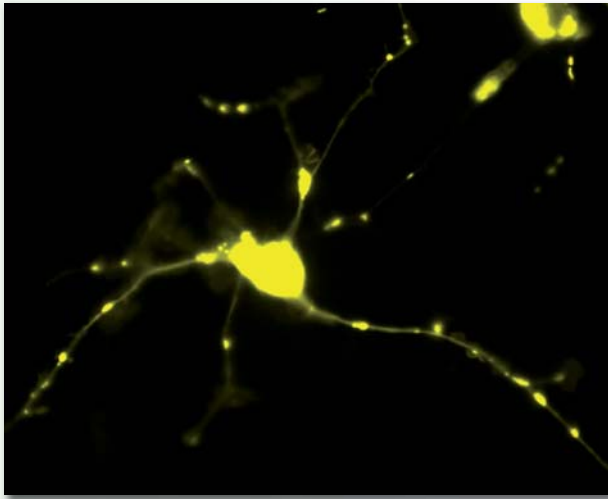
De eerste transfectiemethode maakt gebruik van calciumfosfaat dat complexen vormt met het negatief geladen DNA die dan op hun beurt door hun grote massa door het plasmamembraan de cel kunnen binnendringen. Zodoende kan het construct van de ingebrachte vector overgeschreven en tot expressie gebracht worden (Figuur 4 - 14). Twee verschillende vectoren die instaan voor de expressie van mitochondriale merkers werden volgens deze methode uitgevoerd. De *mito DsRed* (Figuur 4 - 15) en *mito YFP* (Figuur 4 - 16) constructen coderen respectievelijk voor een geel of een rood fluorescent proteïne met een N-terminale signaalsequentie die zorgt dat het eiwit specifiek naar de mitochondriën wordt



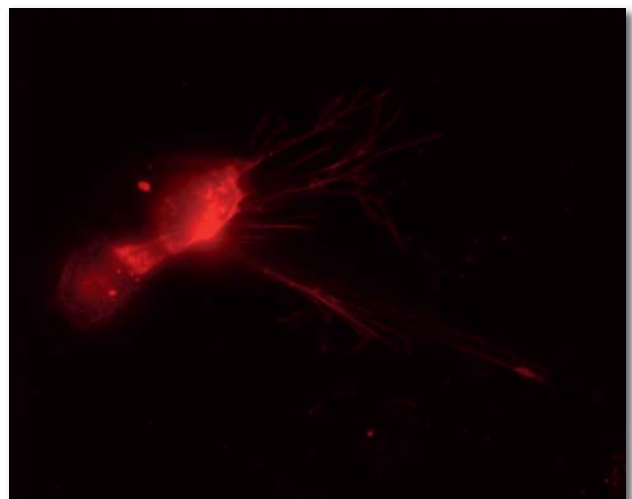
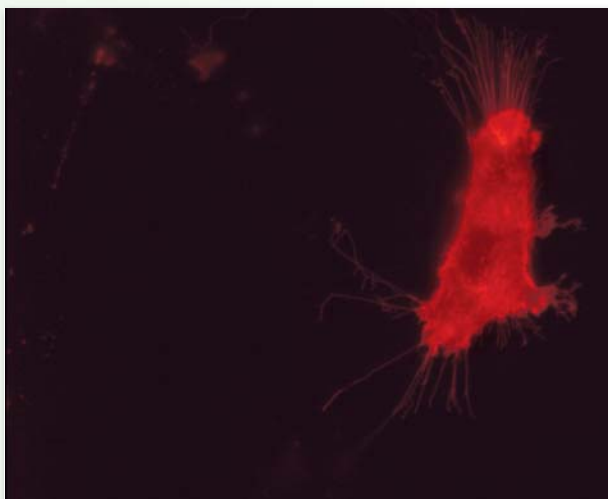
Figuur 4 - 14: Vector met DNA-construct voor de expressie van fluorescente merkers in mitochondriën. XFP is bijvoorbeeld *YFP* of *DsRed*.



Figuur 4 - 15: Transfectie via calciumfosfaat van *mito DsRed*.



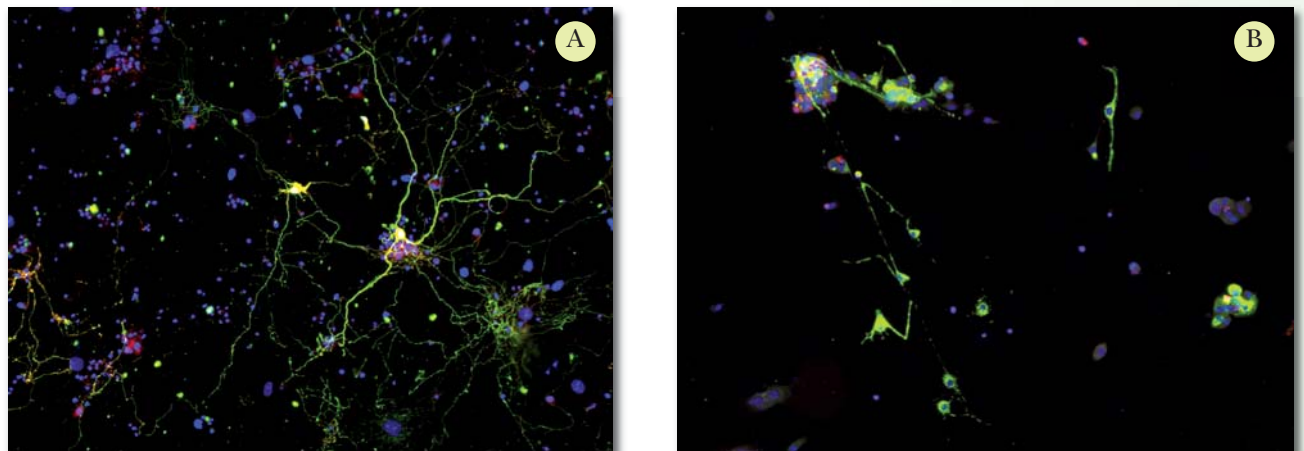
Figuur 4 - 16: Transfectie via calciumfosfaat van *mito YFP*.



Figuur 4 - 17: Het rode kanaal (*farnyسلated mCherry*) van de Co-transfectie via calciumfosfaat van *mito YFP* en *farnyسلated mCherry*.

getransporteerd. Om de morfologische identificatie van de celtypes en hun overeenkomstige vezels te vereenvoudigen werden co-transfecties van *mito YFP* en *farnesylated mCherry* (Figuur 4 - 17) getest. Expressie van deze laatste vector resulteert in de productie van een gefarnesyleerd, rood fluorescent eiwit. De farnesylgroepen interageren met het celmembraan zodat dit rood aangekleurd wordt.

Omdat het binnendringen van calciumzouten een stochastisch proces is afhankelijk van de beschikbare celmembraanoppervlakte, is de transfectie-efficiëntie in neuronen laag. Een transfectie-efficiëntie van 22,2 % werd berekend (bijlage A.8) na het bepalen van het totaal aantal aanwezige cellen met behulp van een immunohistochemische kleuring van de fluorescente proteïnen (anti-GFP), de neuronen (anti-PGP 9.5) en de celkernen (DAPI) (Figuur 4 - 18). Deze transfectie-efficiëntie is hoger dan verwacht omdat het totaal aantal



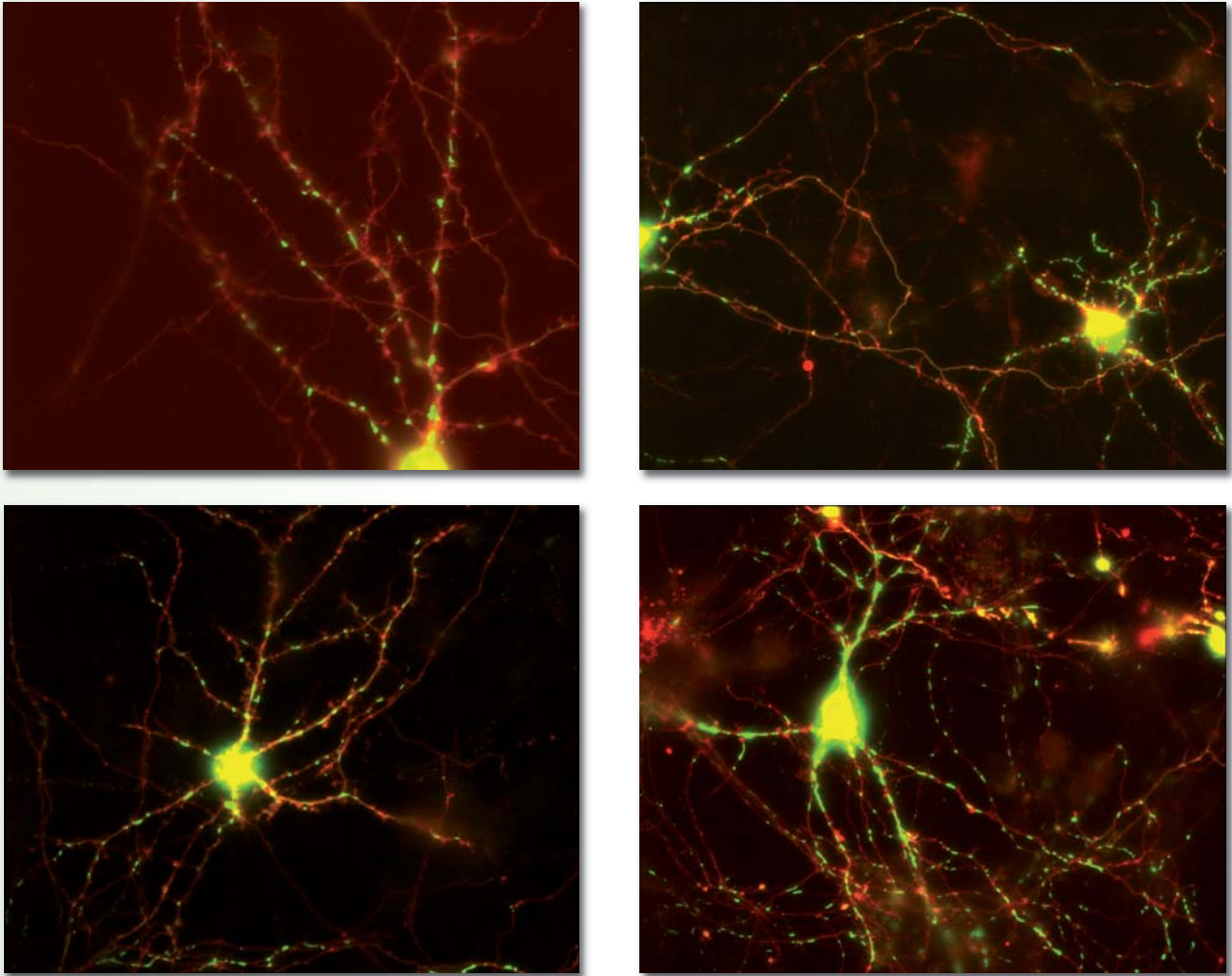
Figuur 4 - 18: Immunohistochemische kleuring van de fluorescente proteïnen (anti-GFP), de neuronen (anti-PGP 9.5) en de celkernen (DAPI) voor het bepalen van de transfectie-efficiëntie in celculturen met A. Striatale en B. Enterische neuronen.

neuronen per celcultuur laag bleek in de enterische culturen. Een hogere dichtheid aan neuronen zal bekomen worden door de groeifactoren te variëren bij het maken van de celculturen.

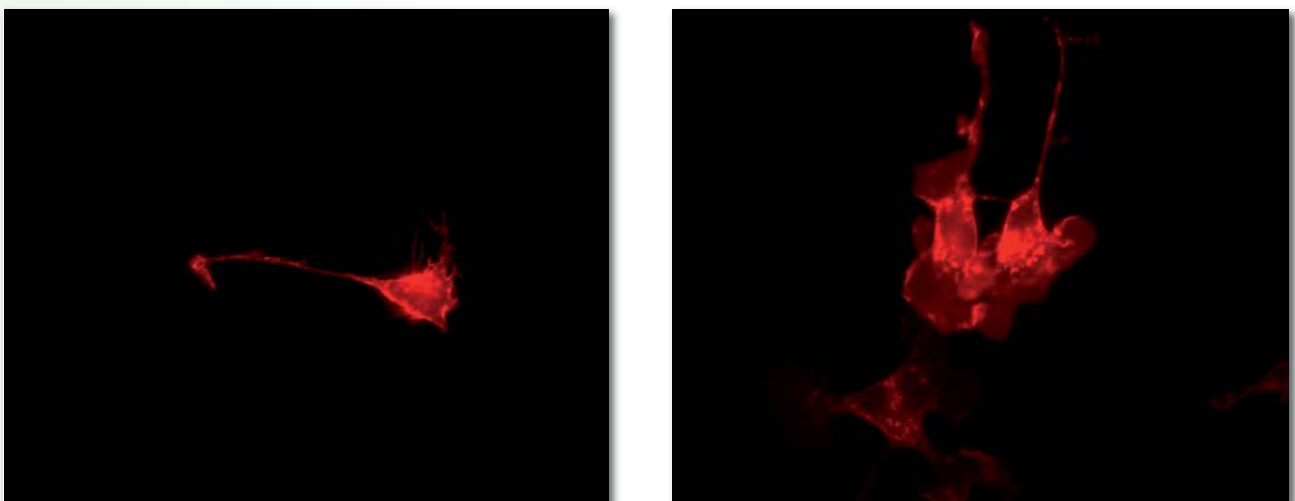
Een tweede methode voor transfectie is lipofectie. Bij lipofectie worden met een mengsel van lipiden positief geladen vesikels aangemaakt die het negatief geladen DNA-materiaal omringen in een dubbele laag fosfolipiden. Het vesikel versmelt met het celmembraan en stelt het DNA-materiaal vrij in de cel. Lipofectamine (Invitrogen, Merelbeke, België) is een voorbeeld van dit soort transfectiereagens en werd gebruikt voor de co-transfectie van striatale neu-

ronen (*corpus striatum*) met *farnesylated mCherry* en *mito YFP* (Figuur 4 - 19).

Een derde en laatste transfectiemethode verloopt met behulp van kationische



Figuur 4 - 19: Co-transfectie van striatale neuronen (*corpus striatum*) met *farnesylated mCherry* en *mito YFP*.



Figuur 4 - 20: Transfectie via kationische polymeren (JetPEI) van *mito DsRed*.

polymeren. DNA kan ook ingebracht worden met behulp van positief geladen polymeren die een complex vormen met het DNA dat door de cel opgenomen wordt. JetPEI (PolyPlus, Berkeley, CA, VSA) is hier een voorbeeld van, dat gebruikt werd voor een transfectie met *mito DsRed* (Figuur 4 - 20).

Transfecties bieden een oplossing voor het identificeren van celtypes omdat cel-specifieke promotoren in de vector kunnen geïncorporeerd worden en zo cel-specifieke kleuring bieden. Het onderscheiden van uitlopers en het identificeren van de bijhorende cellichamen wordt eenvoudiger wanneer naburige cellichamen en uitlopers niet gekleurd zijn of wanneer een bepaald celttype met een specifieke kleuring in beperkte dichtheid voorkomt in de celcultuur. De lage transfectie-efficiëntie in primaire culturen van neuronen heeft echter wel het nadeel dat meer experimenten nodig zijn om eenzelfde hoeveelheid data te bekomen.

4.4.3 Bespreking van de resultaten

Uit de resultaten blijkt dat ook in deze muisculturen met enterische neuronen een aantal concepten uit de literatuurstudie naar boven komen. Zo is er in de neuronen een spreiding van vele stationaire mitochondriën over de uitloper die de neuronale structuren lokaal van energie kunnen voorzien. Het blijkt ook dat op gebied van mitochondriaal transport glia gelijkaardig gedrag vertonen als neuronen. Dit komt overeen met het idee dat glia ondersteunend zijn in de werking van neuronen. Gliacellen worden steeds meer als cellen beschouwd die een belangrijke rol vervullen in neurale processen. In vergelijking met celttype B lijken neuronen het transport efficiënter te organiseren. Er is meer gericht transport, er zijn minder richtingsveranderingen en er is een grotere spreiding van stationaire mitochondriën. De hier verkregen parameterwaarden kunnen verschillen van wat in de literatuur kan worden gevonden. Er moet echter steeds rekening gehouden worden dat veel studies vertrekken van een verschillend diermiddel zoals rat of *Drosophila* en dat de gebruikte neuronen afkomstig kunnen zijn van een verschillende regio (CZS, EZS, ...). Metingen kunnen ook uitgevoerd zijn bij een verschillende temperatuur. Daarbij komt nog dat karakterisatie van mitochondriaal transport in celttype B en gliacellen amper beschreven zijn in de literatuur. Toch kan dit zijn waarde hebben in fundamenteel onderzoek.

4.5 Besluit

Uit de cijfergegevens blijkt dat in deze muisculturen met enterische neuronen meer transportactiviteit plaats vindt in celtype B maar dat transport in neuronen efficiënter is aangezien voor neuronen minder oscillerende mitochondriën en meer 'rechtstreeks' transport (mitochondriën zonder richtingsveranderingen en een beduidende span) waargenomen is. Ook bewogen de neuronale mitochondriën minder ver en minder lang. Uit de meeste parameters blijkt ook een grotere gelijkheid tussen transport in glia en neuronen. Verder werden in neuronen veel stationaire mitochondriën vastgesteld met een gelijkmatige verdeling over de uitloper.

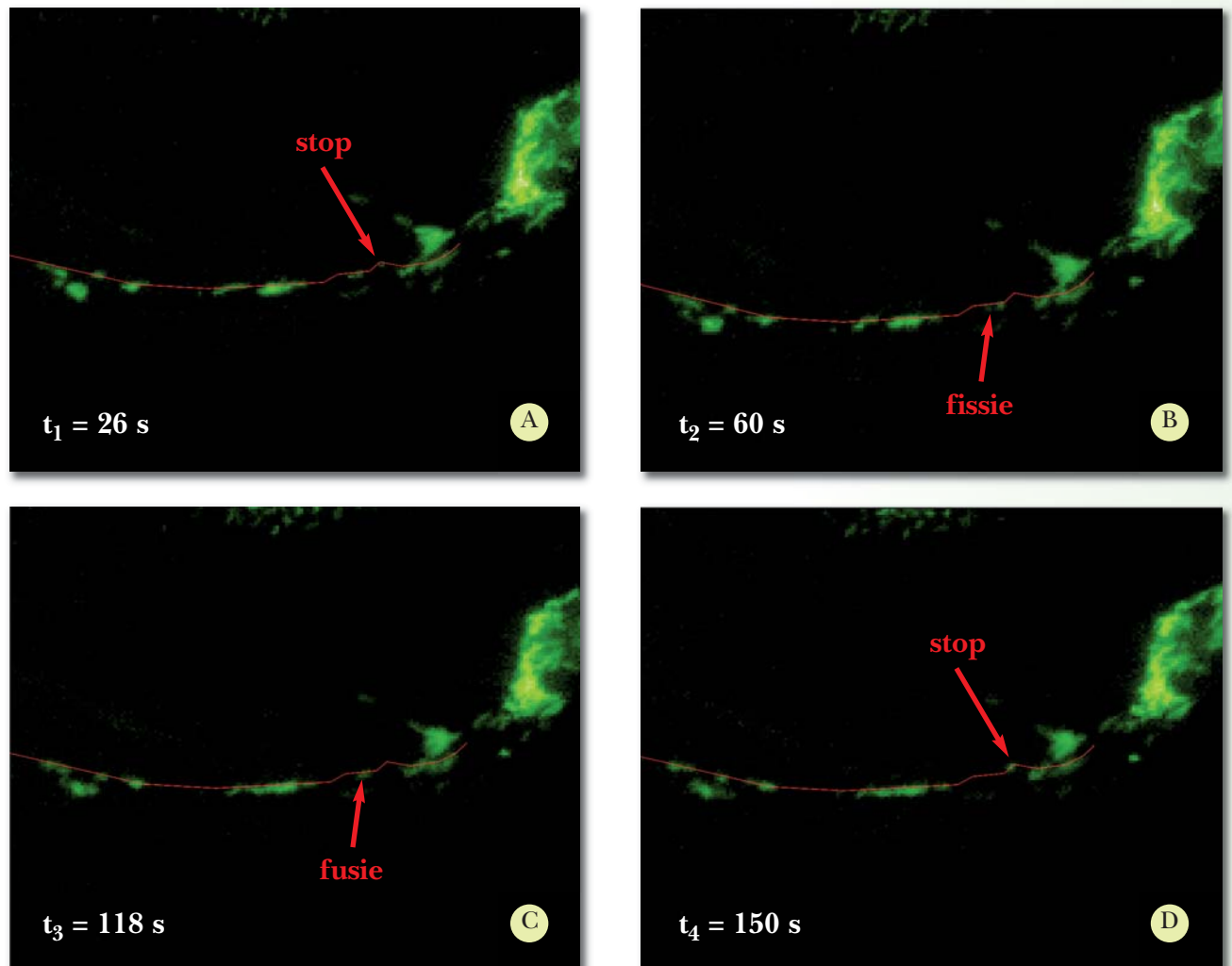
4.6 Specifieke transportfenomenen

Tijdens de video-opnames werden ook een aantal interessante celbiologische gebeurtenissen die niet onmiddellijk voor de beschrijving van het (axonaal) transport in aanmerking komen, geregistreerd. Hierna volgen een aantal observaties van gedrag van individuele mitochondriën die kunnen leiden tot het onderzoek van dit specifiek fenomeen. Er zal kwalitatief aangegeven worden hoe vaak de gebeurtenis is vastgesteld. Ze zijn niet actief gezocht, maar eerder geregistreerd nadat ze opgevallen waren. De beschrijving van deze fenomenen kan een hulpmiddel zijn voor het zoeken naar verklaringen van specifiek transportgedrag. Desalniettemin zullen ze ook leiden tot nieuwe vragen die onderwerp zijn van discussie. Op deze vragen zal hier niet dieper ingegaan worden omdat ze te ver zouden leiden.

1) Twee mitochondriën die over hetzelfde spoor retrograad bewegen, blijven op dezelfde plaats oscilleren waar het spoor een wending maakt op hun weg naar het cellichaam (Figuur 4 - 21A,D). Wanneer ze deze locatie verlaten is er een plotse acceleratie. Aangezien beiden op dezelfde plaats stoppen en oscilleren is er vermoedelijk invloed van mechanische factoren (vorm van het spoor, uitloperform, druk van naburige cellen of uitlopers, ...). Ook lijkt het tweede mitochondrion fissie en fusie te ondergaan. Het vertrekken van het eerste mitochondrion lijkt het gevolg van een fissie in drie nieuwe mitochondriën te zijn (Figuur 4 - 21A,B). Terwijl het tweede mitochondrion

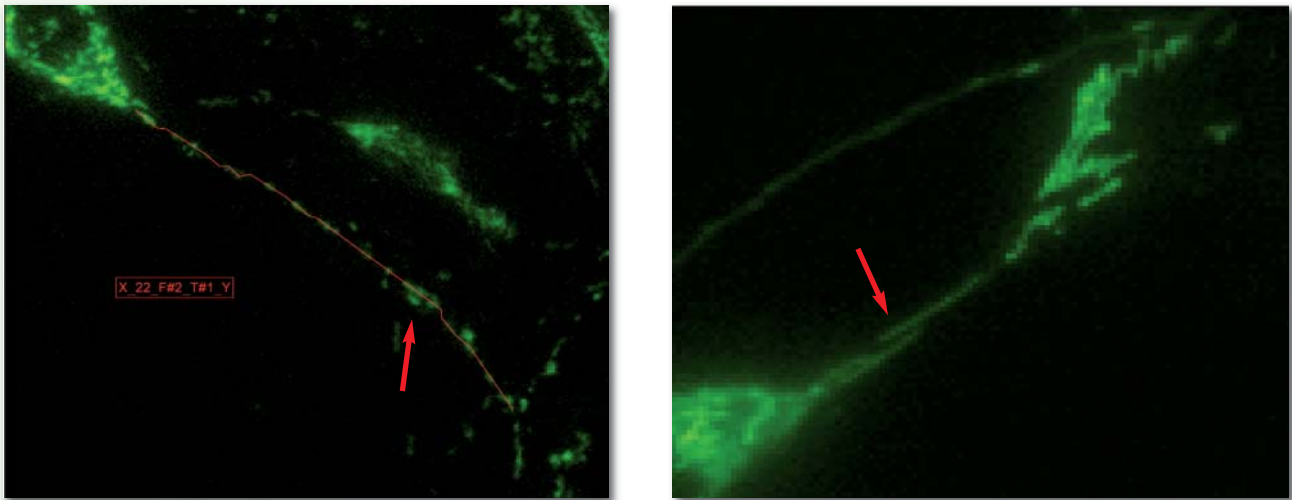
opnieuw fusie ondergaat met het laatste alvorens het de eerste wending 'overwint' (Figuur 4 - 21C). Dit werd vastgesteld in celtype A.

2) Mitochondriën bewegen parallel zowel anterograad als retrograad (Figuur 4 - 22). Dit verschijnsel komt veelvuldig voor. Parallel transport werd vaak vastgesteld waar het cellichaam overgaat in een uitloper. Vermoedelijk bestaan



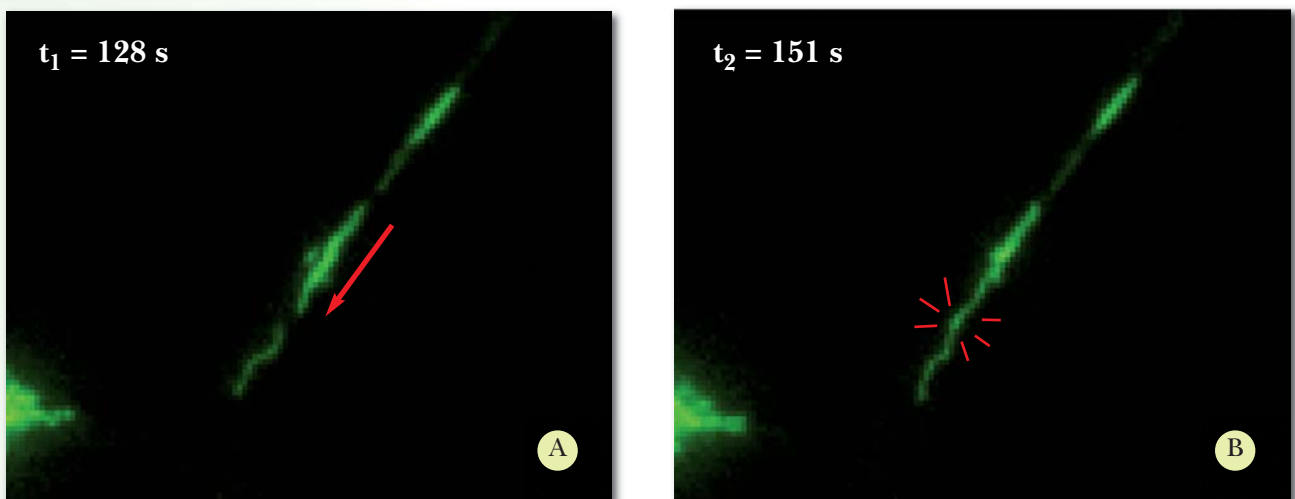
Figuur 4 - 21: A. Het eerste mitochondrion ondergaat fissie, versnelt en oscilleert in een wending. B. Twee mitochondria blijven over na fissie. C. Ze ondergaan opnieuw fusie. D. Het nieuw gevormde mitochondrion twee verplaatst zich en blijft oscilleren in dezelfde wending.

daar verschillende parallele cytoskeletsporen die een eind doorlopen in de uitloper om mitochondriën zonder invloed van andere mitochondriën gemakkelijk te transporteren¹⁰². De parallele sporen zouden dan dienst doen als spoorwissels om botsing en accumulatie van mitochondriën met verschillende snelheid (sneller, trager of tegengesteld) te vermijden.

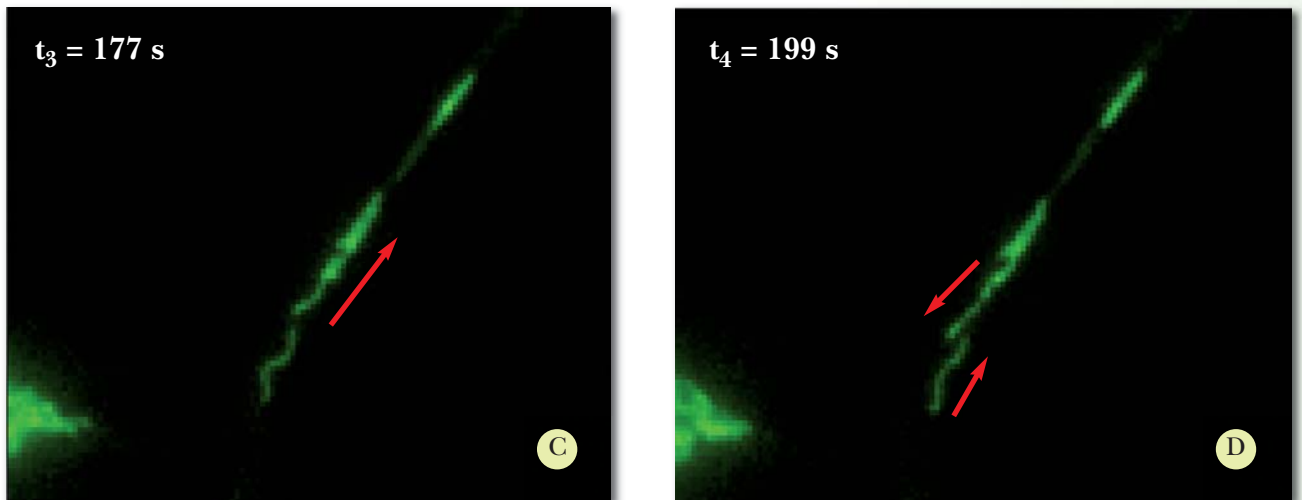


Figuur 4 - 22: Mitochondriën bewegen parallel in antero- en retrograde richting, voornamelijk waar het cellichaam overgaat in de uitloper.

In deze context kan ook volgende -weliswaar éénmalige- observatie verklaard worden. Een mitochondrion lijkt in contact te komen met een ander mitochondrion bij retrograad transport (Figuur 4 - 23 A,B). Daarna gaat het mitochondrion over in anterograde beweging (Figuur 4 - 23C), er treedt een verplaatsing op (spoorwissel) en beide mitochondriën komen parallel in plaats van sequentieel (Figuur 4 - 23D).

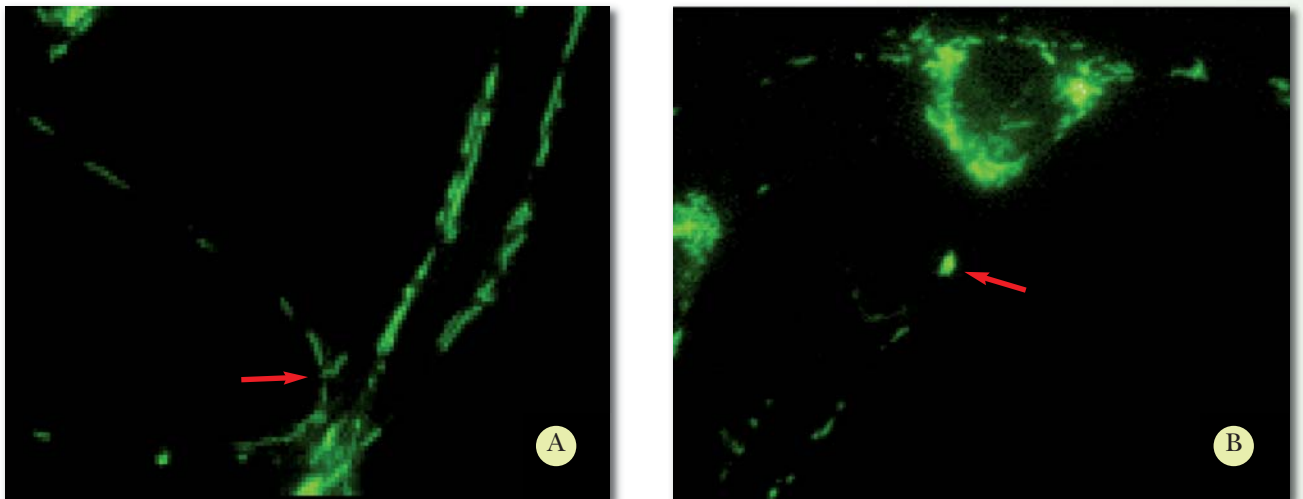


Figuur 4 - 23: A. Een mitochondrion beweegt retrograad transport. B. Het komt in contact met een ander mitochondrion.



Figuur 4 - 23: C. Het gaat over in anterograde beweging. D. Het verplaatst zich zijwaarts en beide komen parallel.

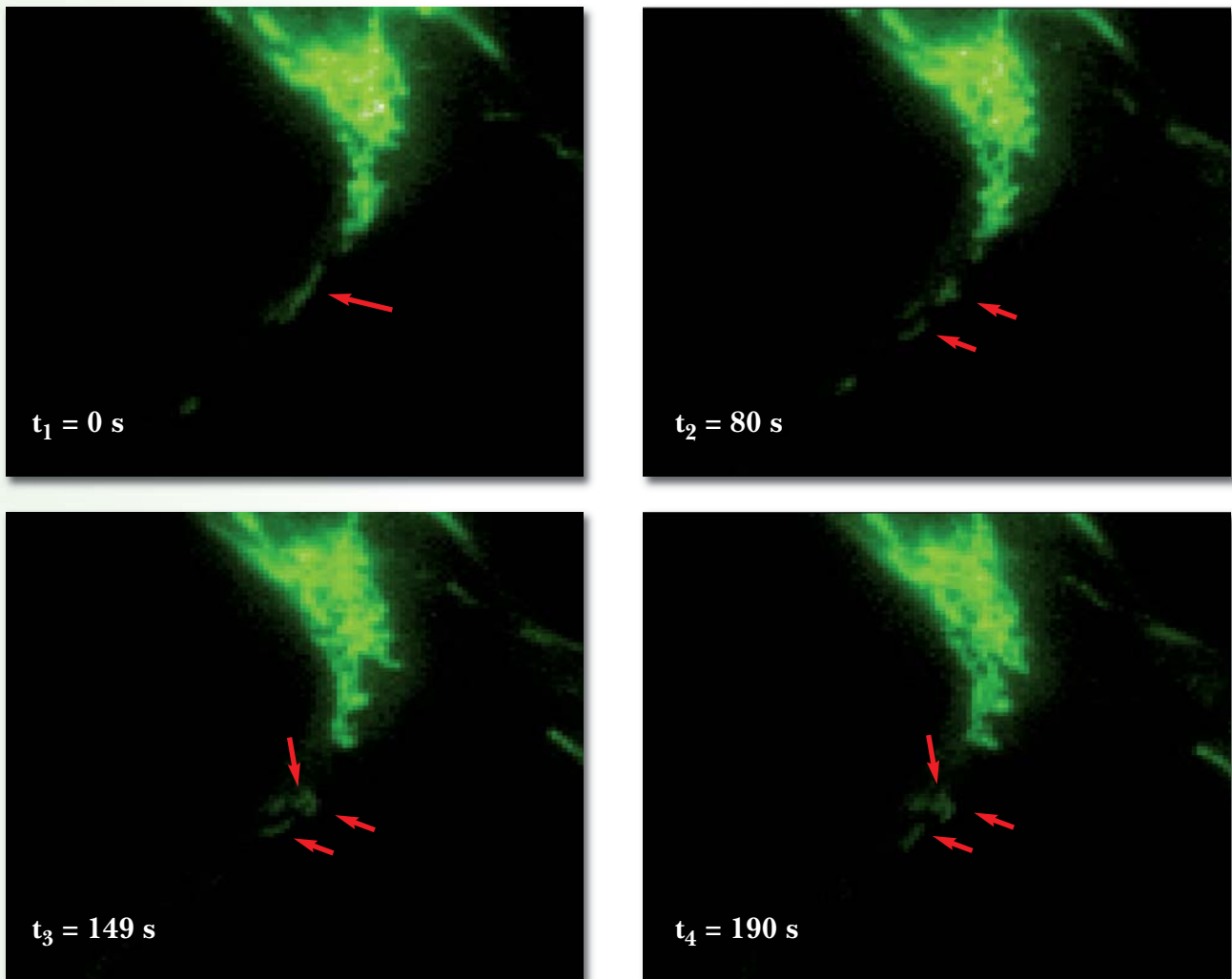
3) Rotatie (of uitwisseling) en dwarse positionering van mitochondriën werd vastgesteld op plaatsen waar de uitloper ontspruit (Figuur 4 - 24A). Deze dwarsliggers lijken, net zoals een grote 'prop' geaccumuleerde mitochondriën, het transport naar de uitloper te verhinderen (Figuur 4 - 24B). Dit werd vastgesteld in celtypes A en B.



Figuur 4 - 24: A. Een mitochondrion in dwarse positie verhindert transport. B. Een mitochondriale 'prop' verhindert eveneens transport.

4) Bij één bijzondere opname lijkt een transportprobleem van een grote mitochondrion opgelost te worden door een fissie in kleinere (Figuur 4 - 25). Dat kan betekenen dat een verband bestaat tussen de grootte van een mitochondrion en het transport ervan, hoewel dit voor mitochondriaal transport in enterische neuronen van de cavia niet kon aangetoond worden³⁶. Na de fis-

sie werd een versnelling vastgesteld. Een dergelijke versnelling is meermaals vastgesteld, ook in een caviacelcultuur.

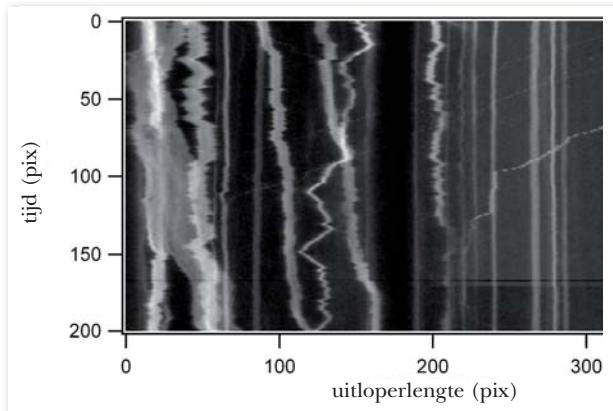


Figuur 4 - 25: Fissie van een groot mitochondrion in drie kleinere mitochondriën kan een transportprobleem verhelpen. Wanneer een mitochondrion afsplitst wordt een versnelling vastgesteld.

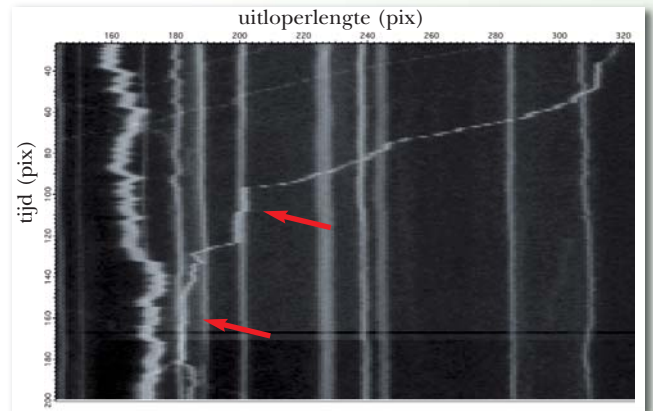
De vraag rijst of het wel effectief over fissie gaat of het eerder passeren of kruisen van verschillende mitochondriën is. Dit kunnen we niet met zekerheid zeggen vanwege beperkte resolutie en omdat *widefield* fluorescentie geen diepte-informatie biedt.

5) Mogelijk helpen oscillerende mitochondriën andere in hun transport (Figuur 4 - 26).

6) Er werd ook vastgesteld dat bewegende mitochondriën gehinderd kunnen worden door stationaire mitochondriën, alhoewel dit niet altijd gebeurt (Figuur 4 - 27).

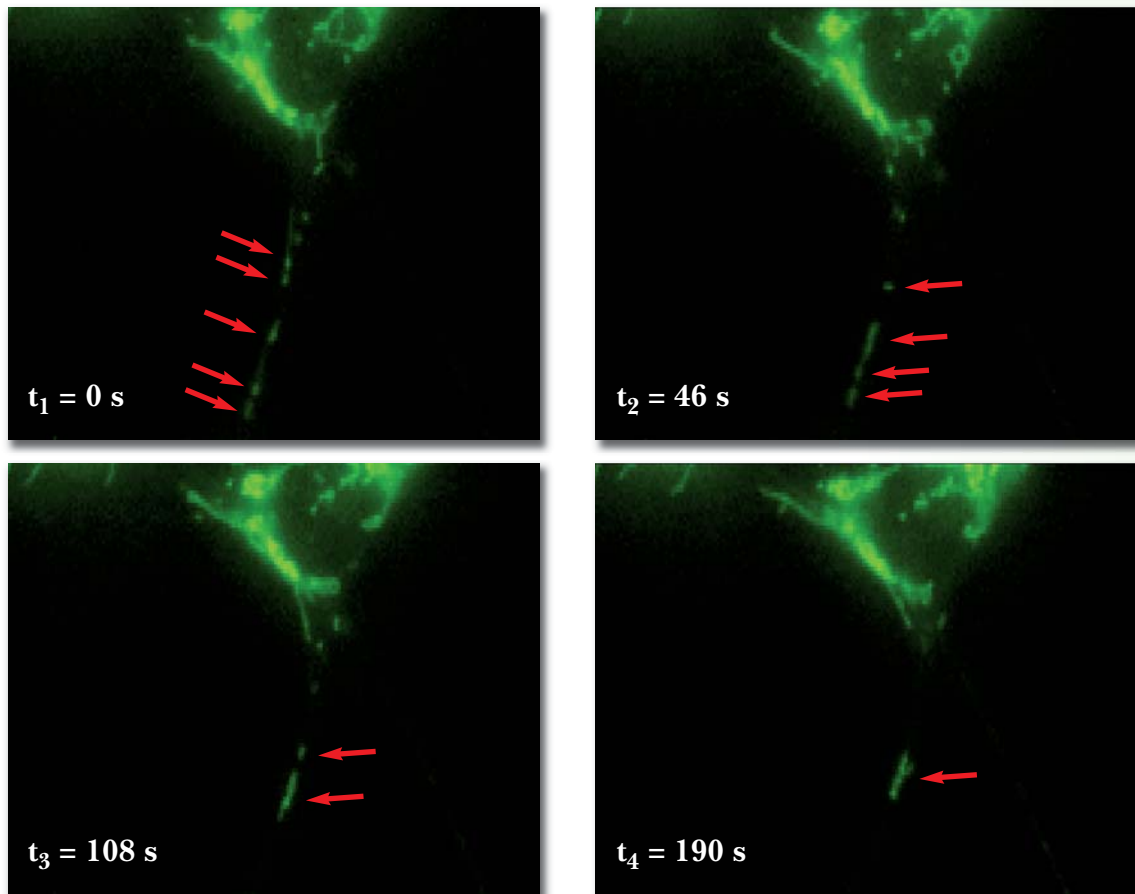


Figuur 4 - 26: Mogelijk helpen oscillerende mitochondriën andere in hun transport.



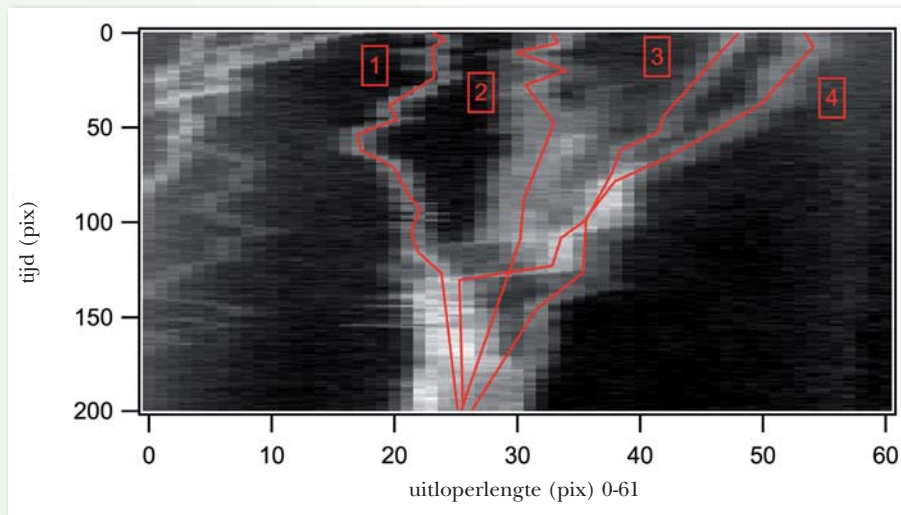
Figuur 4 - 27: Bewegende mitochondriën worden soms gehinderd door stationaire.

7) Een mooi voorbeeld van fusie werd geobserveerd waarbij verschillende mitochondriën naar elkaar toe bewegen en een worden. Dit zou impliceren dat ze elkaars snelheid kunnen beïnvloeden (Figuur 4 - 28).



Figuur 4 - 28: Mitochondriën bewegen naar elkaar toe bij fusie.

De fusie was ook duidelijk zichtbaar in de bijhorende tijd/ruimte-kaart (Figuur 4 - 29).



Figuur 4 - 29: Fusie op een tijd/ruimte-kaart.

Uit deze waarnemingen van specifieke transportfenomenen van mitochondriën ontstonden aanwijzingen van factoren die het transport kunnen beïnvloeden. Zo is invloed van mechanische factoren (vorm van het spoor, uitlopervorm, druk van naburige cellen of uitlopers, ...) op het trans-

port waarschijnlijk en lijkt fissie en fusie een rol te spelen in het transport. Fissie zou grote mitochondriën helpen transporteren doordat bij het afsplitsen een acceleratie plaats vindt. Daartegenover kan fusie en accumulatie een hinder betekenen voor het transport. Dat kan betekenen dat een verband bestaat tussen de grootte van een mitochondrion en het transport ervan. Mitochondriën lijken invloed te hebben op elkaars snelheid: gericht transport treedt op wanneer mitochondriën fusie ondergaan. Mitochondriën nabij het cellichaam zijn in staat parallel te bewegen nadat ze op hetzelfde spoor contact maakten. Dit doet vermoeden dat mitochondriën de grootte, zin en richting van elkaars snelheid kunnen beïnvloeden en dat parallelle cytoskeletsporen bestaan nabij het cellichaam. Daar zijn ook rotatie en dwarse positionering van mitochondriën geobserveerd. Mogelijk hebben oscillerende mitochondriën een assisterende functie bij het transport van andere mitochondriën.

5. Potentiaal-afhankelijkheid van mitochondriaal transport

5.1 Inleiding

Dit hoofdstuk beschrijft de experimenten uitgevoerd om te bepalen of een verband bestaat tussen de mitochondriale membraanpotentiala en het transport. Dezelfde celculturen als beschreven in hoofdstuk 4 werden gekleurd met zowel *MitoTracker Green* als tetramethylrodhamine ethyl ester (TMRE), een potentiaalafhankelijke fluorescente merker die in mitochondriën accumuleert. Net zoals voor de beschrijving van het transport werden tijd/ruimtekaarten gemaakt van de bewegingen van mitochondriën in uitlopers van drie celtypes. Het pad van elk spoor werd genomen van de *MitoTracker*kaarten, terwijl de intensiteit van de TMRE-kaarten gebruikt werd. Daarna werden de puntsnelheden gecorreleerd aan de intensiteit van het TMRE-sigitaal. Onder de gegeven condities van deze experimenten werd geen correlatie tussen de puntsnelheden en de mitochondriale membraanpotentiala gevonden. Verder onderzoek moet aantonen of een correlatie tussen de membraanpotentiala van een mitochondrion en de puntsnelheid van naburige mitochondriën bestaat.

Eerst worden de cokleuring en analyse beschreven, in hoofdzaak de functies die ontwikkeld werden om de correlaties uit te voeren. Vervolgens worden de resultaten weergegeven in grafieken met de correlatiecoëfficiënten en spreidingsdiagrammen. Daarna volgt een bespreking van de moeilijkheden bij de analyse, enkele beschouwingen over TMRE als potentiaalindicator en de resultaten. Er wordt afgesloten met het besluit.

5.2 Materiaal en methoden

5.2.1 Celculturen

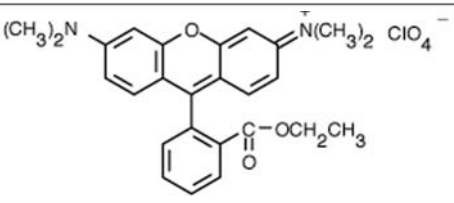
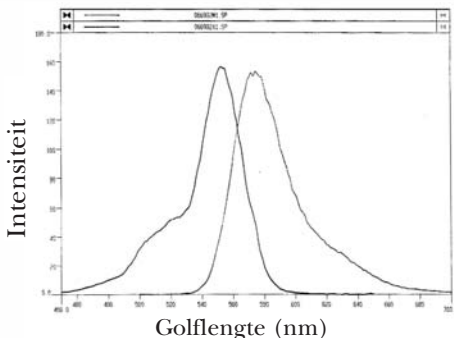
De celculturen voor deze experimenten werden op dezelfde manier bereid zoals beschreven onder 4.2.1

5.2.2 Beeldvorming

De cellen werden gedurende 30 minuten geïncubeerd met 75 nM *MitoTracker*

Green FM (Invitrogen Molecular Probes, Merelbeke, België) in *mouse* medium op 37 °C. Daarna volgde een wasstap voor het verwijderen van overtollige kleurstof, waarbij de celculturen overgebracht werden in cultuurmedium zonder *MitoTracker Green* voor 20 min op 37 °C. Hierna werden de celculturen in HEPES-oplossing overgebracht om de toniciteit van de cellen te garanderen tijdens de microscopopnames. Blootstelling aan licht werd zoveel mogelijk vermeden tussen het laden van *MitoTracker Green* en de opname om foto-bleaching te vermijden. Voor de beeldvorming werd een Zeiss Axiovert 200M microscoop (Carl Zeiss, Oberkochen, Duitsland) met TILL Poly V lichtbron (TILL Photonics, Grafelfing, Duitsland) gebruikt. De metingen werden uitgevoerd bij een temperatuur van 37 °C dankzij een warmte-element aangesloten op de perfusie. Vervolgens werden de cellen 60 seconden geladen met 75 nM TMRE (Figuur 5 - 1) via de perfusie (1 ml/min). In het bad en de perfusie werd gedurende het hele experiment een concentratie van 1 nM onder-

TMRE specificaties (Invitrogen Molecular Probes, Merelbeke, België)

Omschrijving	Celdoorlaatbare kationische orangerode fluorescente kleurstof die onmiddellijk opgenomen wordt door actieve mitochondriën.
Excitatie/Emissie	Groen (570 nm)/Oranjerood (600 nm)
Platform	Fluorescentie microscoop
Detectie methode	fluorescentie
Subcellulaire locatie	mitochondriën
Brutoformule	C ₂₆ H ₂₇ ClN ₂ O ₇
Moleculaire massa	514,9615 g/mol
CAS naam, nummer	Xanthylium, 3,6-bis(dimethylamino)-9-[2-(ethoxycarbonyl)phenyl]-, perchlorate/ 115532-52-0
Figuur 5 - 1: Structuurformule van TMRE.	
Figuur 5 - 2: Absorptie- en emissiespectrum van TMRE.	

houden door toevoegen van 1nM TMRE aan de HEPES-oplossing. De *MitoTracker Green*/TMRE-cokleuring werd simultaan opgenomen met voor *MitoTracker Green* excitatie van 475 nm blauw licht en groen emissielicht van 525 nm en voor TMRE excitatie van 570 nm groen licht en oranje-rood emissielicht van 600 nm (Figuur 5 - 2) met een gekoelde CCD-camera (PCO Sensicam-QE, Kelheim, Duitsland) en TillVisION software (TILLPhotonics) met een opnamesnelheid van 1 beeld (640 x 512 pixels) per seconde.

5.2.3 Beeldanalyse

De beeldanalyse gebeurde volledig analoog aan de methode beschreven in 4.2.3 en dezelfde hulpmiddelen werden toegepast. Hier werd echter ook gebruik gemaakt van de nieuw ontwikkelde automatische aanduidmogelijkheden die volledig beschreven werden in hoofdstuk 6. De uitlopers werden eerst aangeduid in de *MitoTracker Green*opname en een tijd/ruimte-kaart werd opgeslagen voor elke uitloper. Dezelfde aanduiding werd daarna gebruikt in de overeenkomstige TMRE-opname waar eveneens een tijd/ruimte-kaart van gegenereerd werd. Op de *MitoTracker* tijd/ruimte-kaart werden de sporen van de mitochondriën aangeduid. Vervolgens werden de bekomen paden gekopieerd op de TMRE-tijd/ruimte-kaart en opgeslagen. Zo werden paden verkregen die bepaald werden door de *Mitotracker*opnames en bijhorende intensiteitsprofielen die bepaald werden door de TMRE-opnames. In tegenstelling tot de *Mitotracker*experimenten werden hier geen lijsten met transportparameters opgevraagd, maar werden de paden, die de positie-informatie bevatten, en de intensiteitsprofielen verzameld in een map per celtype om nadien beiden te correleren.

5.2.4 Dataverwerking en presentatie

De intensiteitsprofielen werden door de reeds ontwikkelde procedures (*Laboratory for Enteric NeuroScience*) wel bewaard, maar er bestonden nog geen mogelijkheden om deze gegevens te verwerken. Om die reden werden twee functies ontwikkeld om de intensiteitsprofielen van de mitochondriën te correleren aan hun posities, puntsnelheden en acceleratie.

De basisfunctie heet *CorrelateIntensity* en aanvaardt het intensiteitsprofiel en

de positie-informatie van één mitochondrion (bijlage B.1). Een eerste en tweede differentiatie van de positie wordt genomen volgens de centrale differentie methode om de puntsnelheden en versnelling te bekomen. Daarna wordt een kruiscorrelatie gemaakt van de intensiteit met elk van deze drie parameters (positie, snelheid, versnelling). Deze correlatiefuncties worden opgeslagen in een nieuwe map *correlation_data* die alle correlatiedata bijhoudt. Ook worden drie lineaire Pearson correlatiecoëfficiënten van de correlatie tussen intensiteit en positie, snelheid en versnelling berekend en opgeslagen in deze map.

De correlatiefuncties werden niet gebruikt voor deze experimenten, maar geïmplementeerd voor toekomstig gebruik en voor de algemene inzetbaarheid van de functie *CorrelateIntensity*.

De tweede ontwikkelde functie *CorrelateGroup* (bijlage B.2) is argumentloos en dus heel eenvoudig toe te passen door de gebruiker via de Igor *command-line*. Deze functie doorzoekt de map met paden van mitochondriën, *particle_traces*, naar hun positie-informatie en zoekt vervolgens automatisch de bijhorende intensiteitsinformatie. Wanneer de positie-informatie en het bijhorend intensiteitsprofiel van een mitochondrion gevonden is, wordt de basisfunctie *CorrelateIntensity* erop toegepast. Dit wordt herhaald voor alle gevonden positie-informatie, dus voor elk mitochondrion. De data worden samengebracht in drie spreidingsdiagrammen: intensiteit/positie, intensiteit/snelheid en intensiteit/versnelling. Hierbij krijgt de informatie per mitochondrion een verschillende kleur zodat deze nog traceerbaar is. Tenslotte worden voor elk van de drie verbanden de Pearson coëfficiënten uitgezet in een grafiek.

De data werden opnieuw verzameld per celtype zoals vermeld in tabel 4 - 1.

5.3 Resultaten

Het aantal mitochondriën dat geanalyseerd werd, wordt hieronder per celtype weergegeven (Tabel 5 - 1).

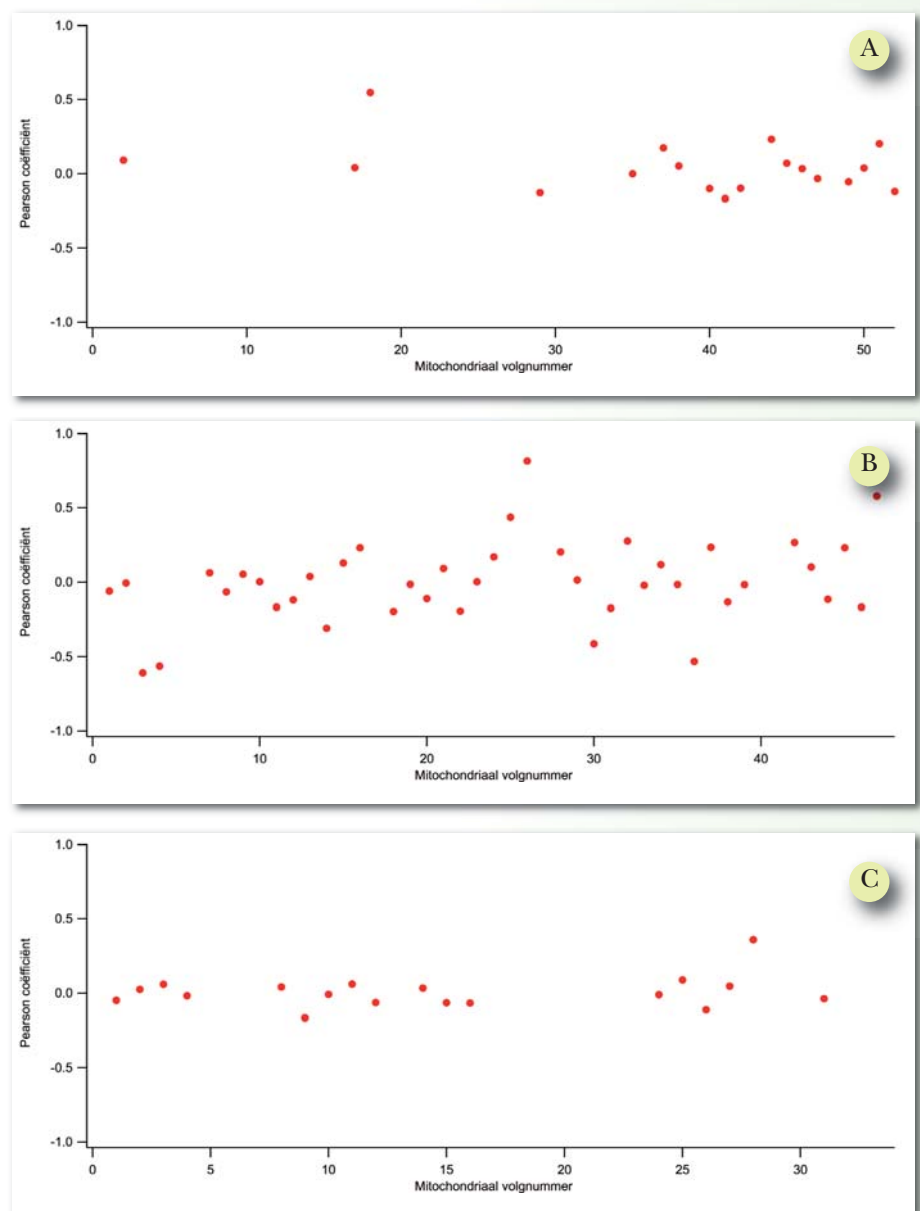
Aantal mitochondriën	
Type A	53
Type B	49
Type C	35

Tabel 5 - 1: Het aantal geanalyseerde mitochondriën per celtype.

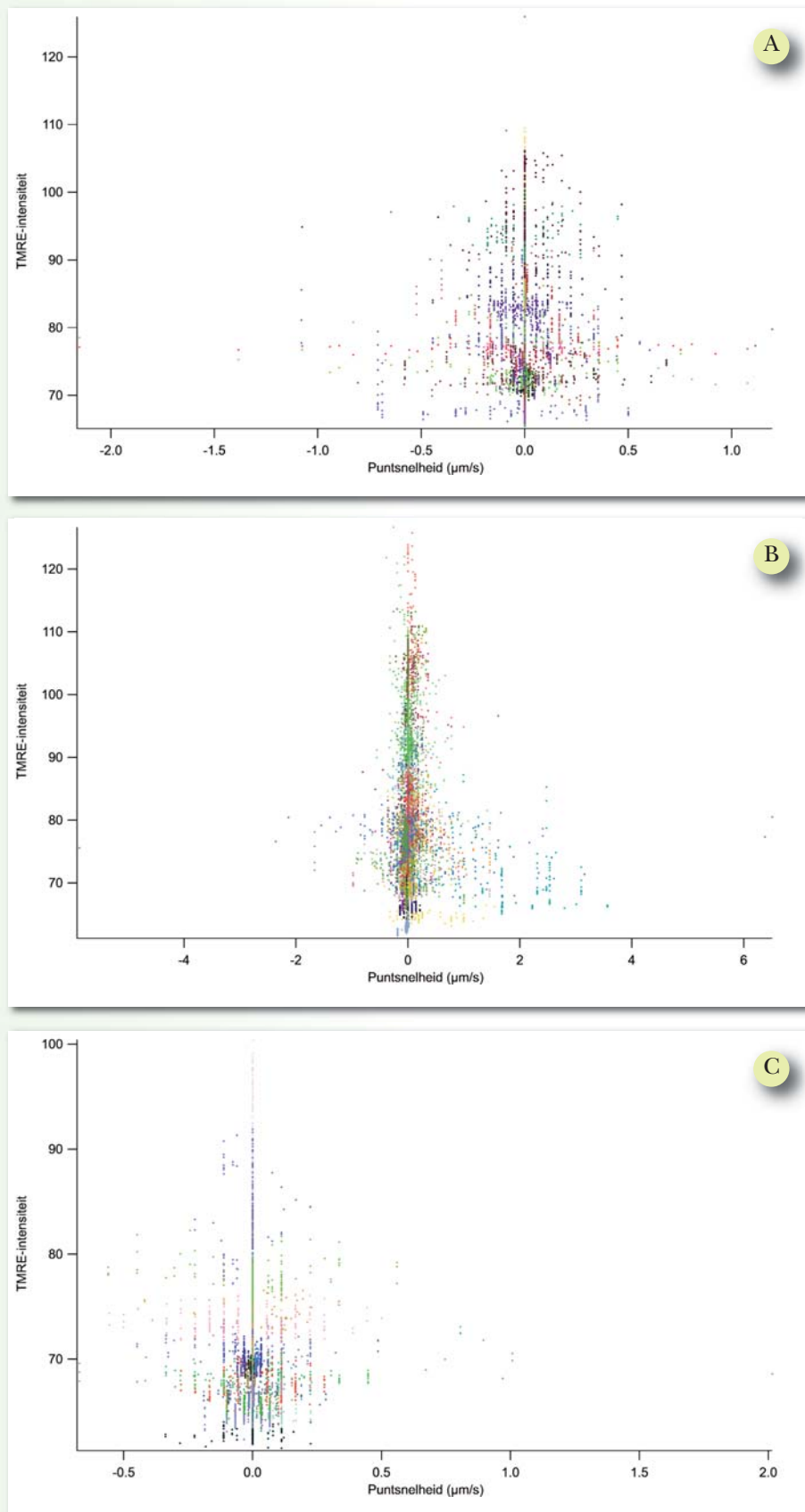
Voor elk van deze mitochondriën werden de puntsnelheden over de volledige opnametijd van 200 seconden gecorreleerd aan de intensiteit van het TMRE-signaal (Figuur 5 - 3). Voor elk mitochondrion werd één Pearson correlatiecoëfficiënt berekend. Deze is in de buurt van 1 of -1 wanneer er een lineair verband is en 0 wanneer er totaal geen verband is. -1 betekent een omgekeerd evenredig verband. Mitochondriën waarvoor de correlatiecoëfficiënt niet kan berekend worden (noemer wordt 0), zijn niet weergegeven in onderstaande grafieken van de correlatiecoëfficiënten.

Aangezien de meeste coëfficiënten zich rond 0 bevinden en er over de drie celtypes slechts één mitochondrion een lineair verband tussen de TMRE-intensiteit en de puntsnelheid ondersteunt, kan er geconcludeerd worden dat in deze dataset geen lineaire correlatie bestaat tussen beide. Ook tussen de TMRE-intensiteit en de versnelling werd geen verband gevonden (bijlage B.3).

Wanneer we de puntsnelheden uitzetten ten opzichte van de TMRE-intensiteit in een spreidingsdiagram waar alle mitochondriën opgeno-



Figuur 5 - 3: Pearson correlatiecoëfficiënten voor correlatie tussen TMRE-intensiteit en puntsnelheid bij A. Celtype A (glia) B. Celtype B en C. Celtype C (neuron).



Figuur 5 - 4: Spreidingsdiagrammen van de TMRE-intensiteit versus punt-snelheden van alle mitochondriën (elk verschillend gekleurd) in A. Celtype A (glia) B. Celtype B en C. Celtype C (neuron).

men zijn in een verschillende kleur, wordt deze conclusie bevestigd (Figuur 5 - 4, bijlage B.4). Alle mitochondriën vertonen zowel hoge als lage intensiteiten voor zowel hoge als lage punt-snelheden. Ook niet-lineaire verbanden worden niet ondersteund door deze spreidingsdiagrammen.

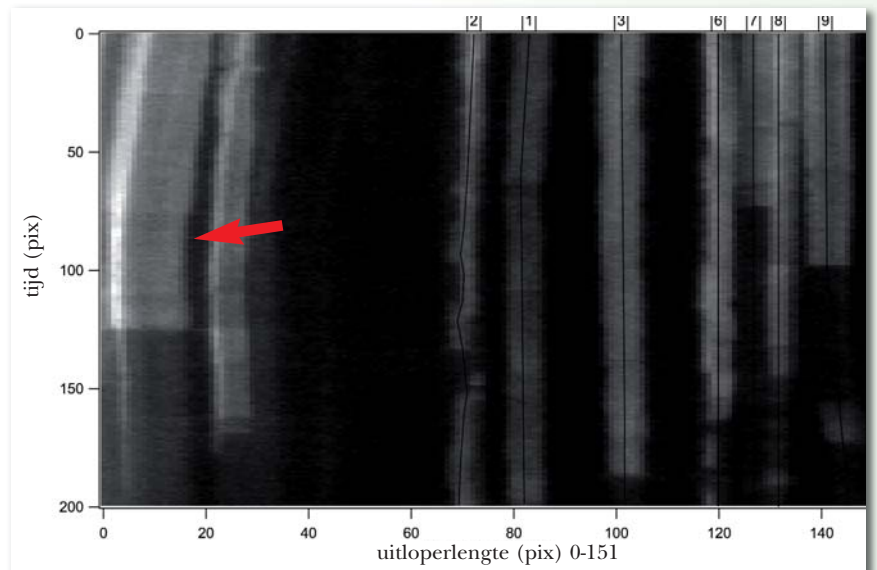
5.4 Discussie

5.4.1 Moeilijkheden bij de analyse

Dezelfde moeilijkheden als beschreven onder 4.4.1 werden ondervonden en dezelfde hulpmiddelen (DIC, maximum-projecties) werden gebruikt om ze te verhelpen. Ook hier waren sporen van mitochondriën soms moeilijk aan te duiden omdat ze 'over' elkaar liepen (Figuur 5 - 5). Door het brede spectrum van TMRE was er ook *bleedthrough* van het TMRE-signaal in het groene meetkanaal. Dit vormde

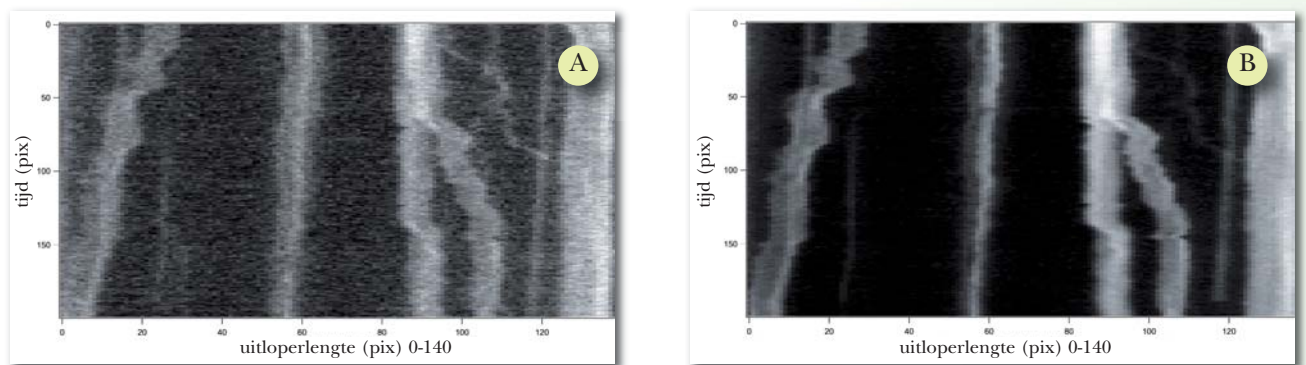
geen belangrijk probleem aangezien de *Mitotracker* tijd/ruimte-kaarten enkel gebruikt werden om de sporen aan te duiden en niet om de intensiteit ervan te gebruiken.

Voor de simultane opname werd een andere filter gebruikt voor het *Mitotracker*-signaal waardoor het signaal



Figuur 5 - 5: Sporen van mitochondriën lopen soms over elkaar.

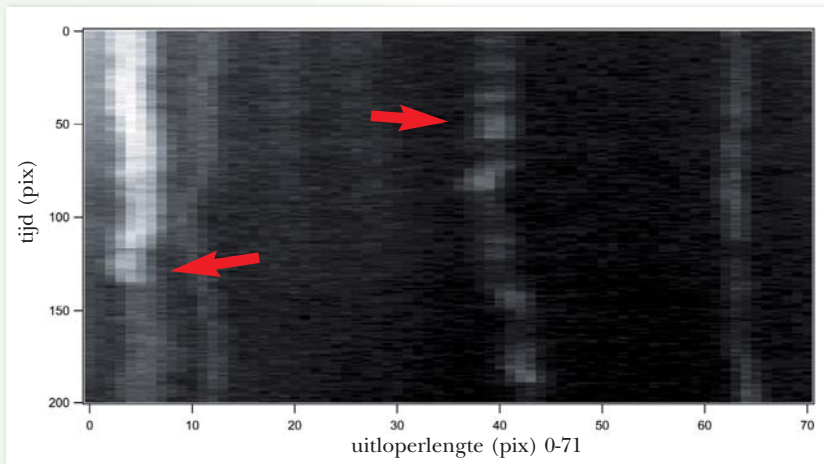
minder contrast en meer ruis bevatte in vergelijking met de TMRE-tijd/ruimte-kaarten (Figuur 5 - 6). Daardoor was het in een beperkt aantal gevallen nodig de paden van de *Mitotracker* tijd/ruimte-kaarten op de TMRE tijd/ruimte-kaarten aan te passen over een tiental pixels zodat ze beter het spoor volgden. Wanneer het spoor op de TMRE-tijd/ruimte-kaarten duidelijk zichtbaar is, vormt dit geen probleem en dit was steeds het geval.



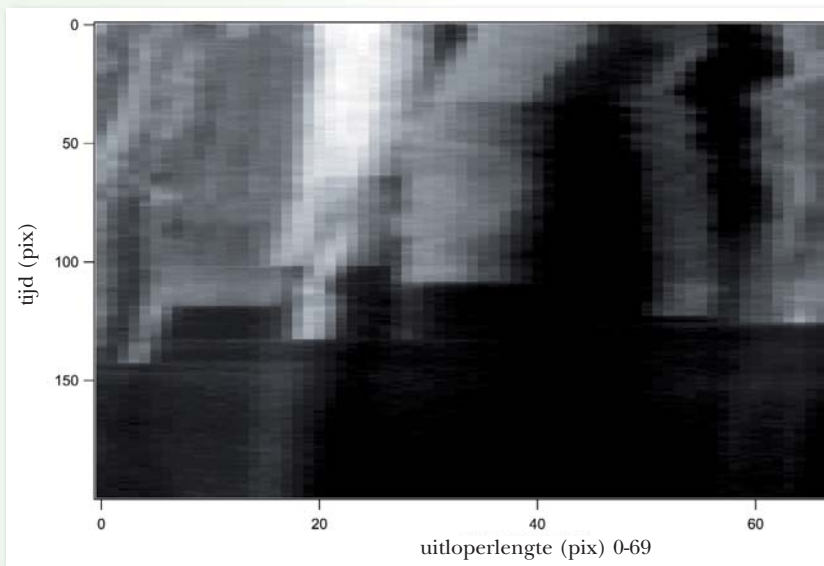
Figuur 5 - 6: Simultane tijd/ruimte-kaarten van A. het *MitoTracker Greensignaal* en B. Het *TMRE-signaal*. Door het gebruik van een andere filter bevat het *MitoTrackersignaal* minder contrast en meer ruis.

5.4.2 TMRE als potentiaalindicator

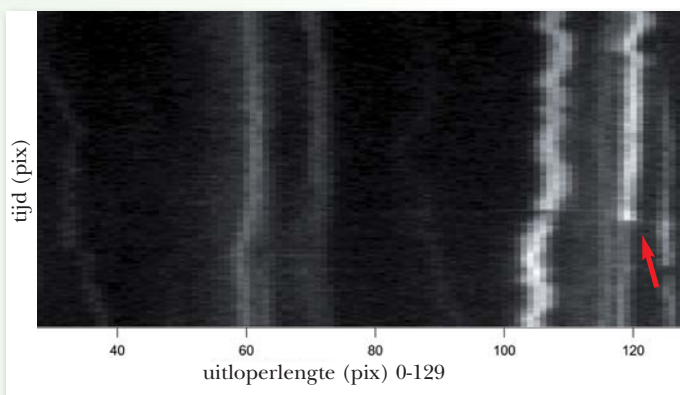
Om zicht te krijgen op de kinetiek van TMRE werden eerst een reeks TMRE-kleuringen gedaan met verschillende concentraties TMRE. Daaruit bleek dat zowel kortstondige intensiteitsveranderingen (enkele seconden) als langdu-



Figuur 5 - 7: zowel kortstondige intensiteitsveranderingen (enkele seconden) als langdurige intensiteitsveranderingen (tientallen seconden) komen voor bij TMRE.



Figuur 5 - 8: Langdurige intensiteitsveranderingen kunnen eindigen in een depolarisatie van (bijna) alle mitochondriën in een uitloper.



Figuur 5 - 9: De intensiteit van naburige mitochondriën verhoogt bij depolarisatie van een mitochondrion.

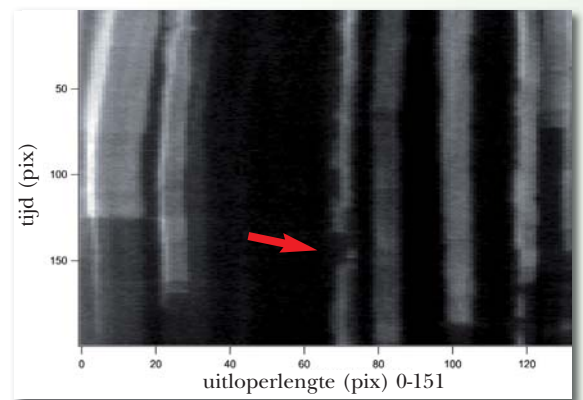
rige intensiteitsveranderingen (tientallen seconden) voorkomen (Figuur 5 - 7), soms zelfs in dezelfde uitloper. De langdurige intensiteitsveranderingen kunnen eindigen in een depolarisatie van (bijna) alle mitochondriën in een uitloper (Figuur 5 - 8). Dit is vermoedelijk een toxisch effect ten gevolge van een te hoge concentratie TMRE. Er blijft ook steeds wat TMRE achter in het membraan waardoor ook uitwas door de perfusie mogelijk een effect heeft aangezien mitochondriën in een uitloper dicht bij de oppervlakte van de cel liggen.

Waar zich een depolarisatie voordeed, werd vastgesteld dat de intensiteit van naburige mitochondriën verhoogde (Figuur 5 - 9). Dit kan wijzen op een

artefact als gevolg van een lokale verhoging van de TMRE-concentratie of het kan betekenen dat er werkelijk een verband bestaat tussen polarisatie en depolarisatie van naburige mitochondriën. Dit is een interessant gegeven voor verder onderzoek.

Er werden ook depolarisaties vastgesteld over een beperkt gedeelte van een mito-

chondrion (Figuur 5 - 10). Dit kan betekenen dat er slechts een deel van dat mitochondrion een verandering van membraanpotentiaal ondergaat ofwel gaat het om twee verschillende mitochondriën die zich ongeveer op dezelfde positie bevinden. Dit onderscheid kan door de beperkingen van het gebruikte optische systeem, niet gemaakt worden in deze context.

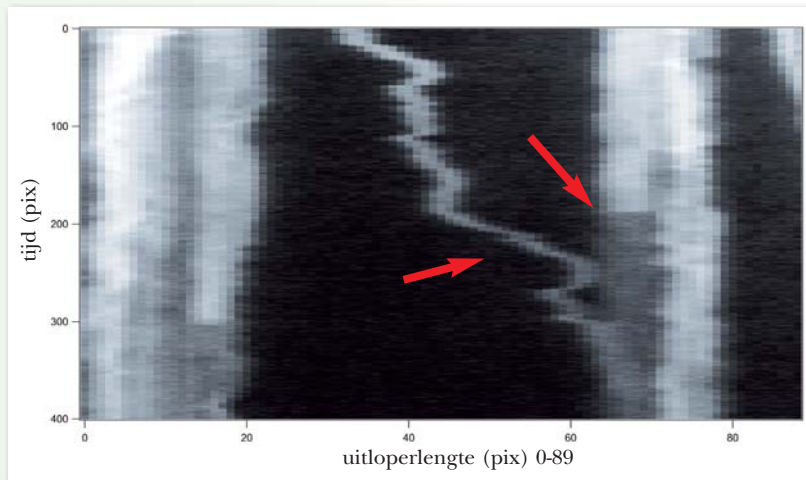


Figuur 5 - 10: Depolarisaties over een beperkt gedeelte van een mitochondrion.

5.4.3 Bespreking van de resultaten

Zowel uit de Pearson correlatiecoëfficiënten als uit de spreidingsdiagrammen is geen correlatie gebleken tussen de mitochondriale membraanpotentiaal en de puntsnelheid van individuele mitochondriën. In een publicatie van Miller en Sheetz³⁴ wordt geconcludeerd dat een hoge potentiaal gecorreleerd is met anterograad transport en een lage met retrograad transport. Daarbij is echter geen gebruik gemaakt van de potentiaalindicator TMRE, maar van de binairre potentiaalindicator JC-1. Volgens Miller en Sheetz volgde een grote meerderheid van de mitochondriën dit verband en voldeed slechts een beperkt percentage mitochondriën er niet aan. Zo werd vastgesteld dat sommige anterograad getransporteerde mitochondriën een lage potentiaal hadden en vice versa. Dat er in de experimenten voor deze thesis algemeen minder transportactiviteit was in de gebruikte culturen kan een oorzaak zijn dat geen correlatie is vastgesteld. Een belangrijk verschil is ook dat Miller en Sheetz gebruik gemaakt hebben van spinale ganglia van kippenembryo's waar in deze thesis gebruik gemaakt werd van enterische neuronen van volwassen muizen.

De kwaliteit van TMRE als potentiometrische merker kan eveneens in vraag gesteld worden, gezien weinig gekend is over het exacte werkingsmechanisme van TMRE en hoe de afhankelijkheid van de potentiaal is. Uit de opnames blijkt dat het weinig waarschijnlijk is dat TMRE zich lineair gedraagt: potentiaalafhankelijke accumulatie in mitochondriën en *wash-out* kunnen elkaar snel opvolgen in enkele seconden tijd.



Figuur 5 - 11: Een mitochondrion versnelt richting een ander mitochondrion op het ogenblik dat het tweede mitochondrion depolariseert. Mogelijk bestaat een verband tussen de membraanpotentiala van een mitochondrion en de snelheid van naburige mitochondriën.

Ondanks deze resultaten is het bestaan van een correlatie tussen de membraanpotentiala en bepaalde transportparameters niet uitgesloten. Zo werd in deze thesis gezocht naar een verband tussen het transport en de membraanpotentiala van hetzelfde mitochondrion, maar is het mogelijk dat de membraanpotentiala van een mitochondrion een invloed kan hebben op de snelheid van naburige mitochondriën (Figuur 5 - 11).

5.5 Besluit

Onder de gegeven condities van deze experimenten werd geen correlatie tussen de puntsnelheden en de mitochondriale membraanpotentiala gevonden. Verder onderzoek moet aantonen of dit specifiek is voor enterische neuronen en of er een correlatie bestaat tussen de membraanpotentiala van een mitochondrion en de puntsnelheid van naburige mitochondriën. Om de relatie nog beter te onderzoeken zullen de celculturen verder geoptimaliseerd worden zodat er meer mitochondriaal transport in de neuronale uitlopers voorkomt.

6. Optimalisatie van de beeldanalyse

6.1 Inleiding

Dit hoofdstuk beschrijft in hoofdzaak de ontwikkeling van een algoritme dat tot doel heeft de analyse van het mitochondriaal transport nauwkeuriger en sneller te laten verlopen. Eerst werd het softwarepakket Igor Pro geassimileerd door ondermeer het alpha-testen van een nieuwe functie van Wavemetrics. Daarna werd het algoritme dat door het zoeken van maximale intensiteit de sporen in een tijd/ruimte-kaart kan volgen, stap per stap ontwikkeld, waarbij telkens een nieuwe, meer uitgebreide functie ontstond uit een voorgaande. Een grafische gebruikersinterface (*graphical user interface*: GUI) werd voor het resulterende semi-automatische algoritme ontworpen. Verschillende adaptatieparameters en opties werden toegevoegd zodat de gebruiker het resultaat van de automatische detectie kan manipuleren. Daarna werden artificiële tijd/ruimte-kaarten gemaakt, waarop de analyse door verschillende ervaren gebruikers en het automatisch algoritme vergeleken werd op gebied van analysetijd en accuraatheid (benchmark). Ook werden doorheen het ontwikkelingsproces en achteraf visuele evaluaties gedaan. Uit beide soorten evaluatie wordt geconcludeerd dat het gebruik van het semi-automatisch algoritme een grote tijdswinst met dezelfde juistheid als een gemiddelde ervaren gebruiker bekomen wordt en dat het algoritme ook voor sterk oscillerende mitochondriën een meerwaarde kan betekenen doordat meer detail wordt gevolgd dan de gemiddelde gebruiker zou aanduiden.

Eerst wordt het gebruikte softwarepakket Igor Pro kort besproken en de noodzakelijke basisprincipes worden vermeld. Daarna wordt het leerproces geschetst dat doorlopen werd aan de hand van de eerder vermelde testopdracht. Vervolgens wordt het basisprincipe van het algoritme en de evolutie in de ontwikkeling ervan uitgeklaard (6.3; bijlage C.3). De volledige verklaring van de werking van het algoritme en alle adaptatieparameters die werden ontwikkeld om de gebruiker controle over het resultaat van het algoritme te bieden, worden in een volgend stuk uitgelegd. In 6.4 wordt beschreven hoe de interface ontwikkeld werd en gekoppeld aan de achterliggende functies (bijlage C.4). Na de bespreking van de visuele evaluatie en de evalu-

atie via een benchmark volgen het besluit en enkele toekomstperspectieven voor de verdere ontwikkeling van het algoritme.

6.2 Igor Pro

6.2.1 Het softwarepakket

Igor Pro is een softwarepakket gemaakt door Wavemetrics® dat heel veel mogelijkheden biedt op vlak van beeldanalyse en dataverwerking. Het programma kan 1D, 2D,3D en 4D-data verwerken. Het standaard datatype in Igor is een *wave*. Een *wave* is het best te vergelijken met een matrix gekend uit de wiskunde. Een *wave* heeft echter naast alle eigenschappen van matrices nog extra eigenschappen zoals een lineaire transformatie voor elke dimensie, eenheden, bijhorende nota's, enz. Op deze *waves* kan een brede waaier aan bewerkingen uitgevoerd worden. Igor beschikt over zowel een grafische gebruikersinterface (GUI) als een *command-line* voor het uitvoeren van opdrachten. Bovendien kunnen gebruikers de bestaande softwareomgeving uitbreiden en volledig nieuwe onderdelen toevoegen dankzij de Igor programmeertaal.

Deze programmeertaal is eenvoudig van syntax en de code wordt toch heel snel uitgevoerd dankzij compilatie. De taal is heel krachtig in het aansturen van de software: er is toegang tot alle ingebouwde functies en eigen bestuursvensters zijn mogelijk. Deze programmeermogelijkheden werden intensief aangewend om de analyse van het mitochondriaal transport te optimaliseren. Meer informatie over Igor Pro en toepassingsvoorbeelden kunnen gevonden worden op www.wavemetrics.com

6.2.2 Assimilatie

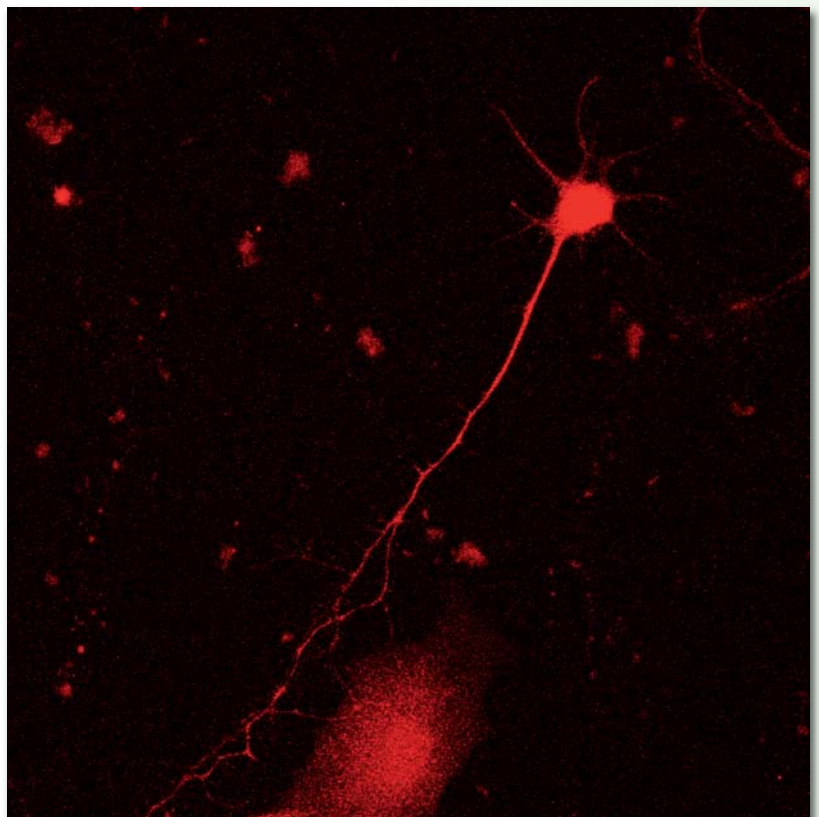
Dankzij de hoge integratie van Igor en de Igor programmeertaal is het leerproces van beide simultaan kunnen verlopen. In de zomer van 2010 werd de handleiding van Igor Pro 6.2 doorgenomen om een vlotte start mogelijk te maken. Met behulp van een concrete opdracht (zie 6.2.3) is de assimilatie van dit softwarepakket aangevat zodat op korte termijn de kennis en vaardigheid van het gebruik en het programmeren in Igor geconsolideerd werd.

6.2.3 Alpha-test van een nieuwe WaveMetrics functie

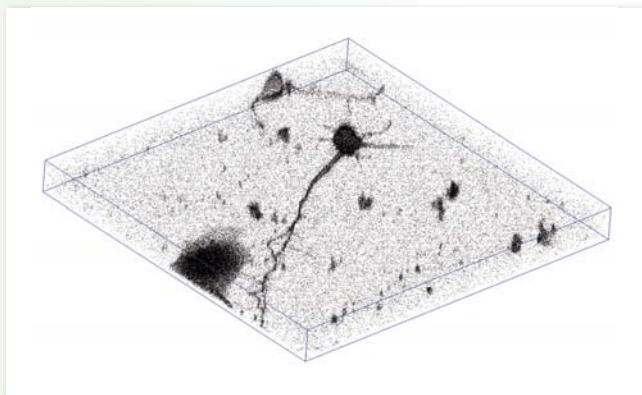
Een nieuwe functie *Skeleton2* die verkregen werd van WaveMetrics werd getest om Igorvaardigheid te verwerven, waarna de uitvoer, verkregen van *real-life* invoer, met een eigen evaluatie teruggezonden werd naar WaveMetrics. *Skeleton2* heeft als functie een eenvoudig skelet van een neuron te extraheren uit 3D-beelddata, bijvoorbeeld afkomstig van een confocale fluorescentie-microscop. De nood aan dergelijke functies en algoritmes is een gevolg van de evolutie naar 3D-opname en -analyse.

Eerst werden 3D-beelden of *Z-stacks* van gefixeerde corticale neuronen in cultuur met een confocale microscoop opgenomen in TIFF-formaat (Figuur 6 - 1A). Deze 3D-beelden deden dienst als inputdata voor *Skeleton2*. Alle beelden uit het TIFF-bestand werden geladen in een Igor 3D-*wave* en gevisualiseerd als voxelgram in Gizmo, de 3D-omgeving van Igor (Figuur 6 - 1B). Een voxelgram is een 3D-voorstelling van puntdata in een 3D-ruimte (voxels).

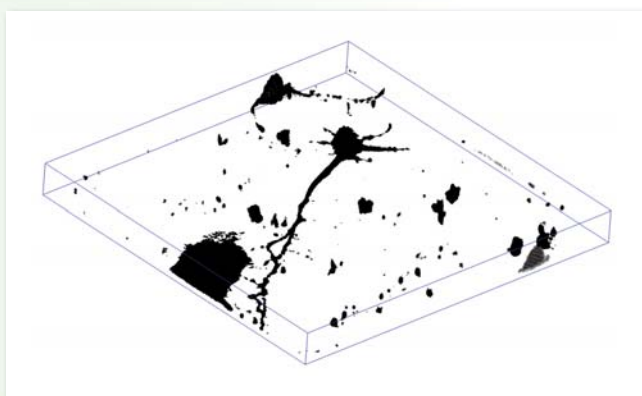
De ruis werd weggewerkt met een zelf geschreven Gaussfilter (bijlage C.1). Bij Gaussfiltering of Weierstrasstransformatie wordt de invoer geconvolveerd met een gaussische functie waardoor de waarden uitgemiddeld worden, gewogen met de waarden van een gecentreerde gaussische verdeling. Algemeen zal het resultaat een gladgestreken beeld zijn waar de hoge frequenties (ruis) sterk gereduceerd zijn. Om de uitwerking eenvoudig te houden werd in het frequentiedomein gewerkt, steunend op het principe dat de reciproke van een gaussische functie in het frequentiedomein ook een gaussische functie is.



Figuur 6 - 1A: Confocale opname van een corticaal neuron.



Figuur 6 - 1B: 3D-weergave in Igor Pro na import.



Figuur 6 - 1C: 3D-weergave na verwijdering van ruis met een eigen Gaussfilter.

Hoewel Gaussfiltering ook direct kan toegepast worden met één van Igor's standaardfuncties zoals *Smooth*, *ImageFilter* of *MatrixFilter* werd toch een eigen functie geschreven om de Igor programmeertaal aan te leren. Het resultaat van deze bewerking, gecombineerd met een aangepaste voorstelling, is een 3D-beeld zonder ruis en een meer uitgesproken beeld van het neuron (Figuur 6 - 1C). Het nadeel is dat een deel van de (kleinere) uitlopers verloren gaat.

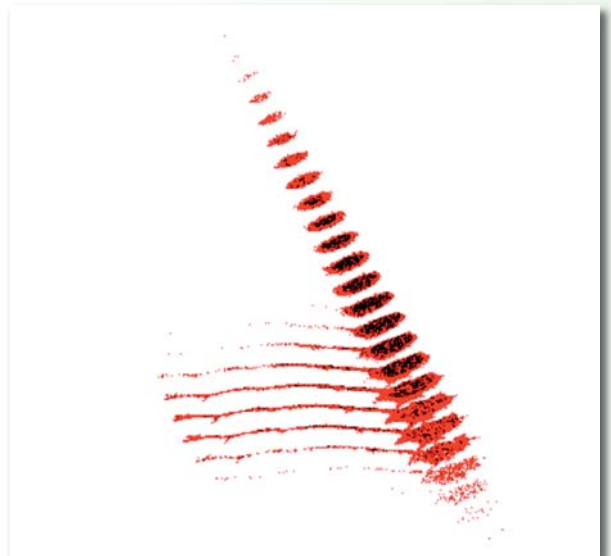
In een volgende stap werd de 3D-*wave* aangepast zodat deze de juiste vorm voor invoer had. De *wave* moet van de vorm *unsigned byte (/B/U)* zijn met binaire voxels: 0 voor de achtergrond en 1 voor een voxel die tot het neuron behoort. Dit resultaat werd bekomen door een *imageSeedFill* operatie uit te voeren (bijlage C.2). Daarbij wordt, vertrekkend van één punt, elk naburig

punt aangeduid als het binnen een vooraf opgegeven bereik valt. Eerst werd een goede *seed* (startpunt) manueel uitgekozen. Dit is een voxel die ongeveer in het centrum van het neuron ligt en een eerder hoge waarde heeft. De uitvoer is een binaire *wave* die kan dienen als invoer voor de *Skeleton2* functie.

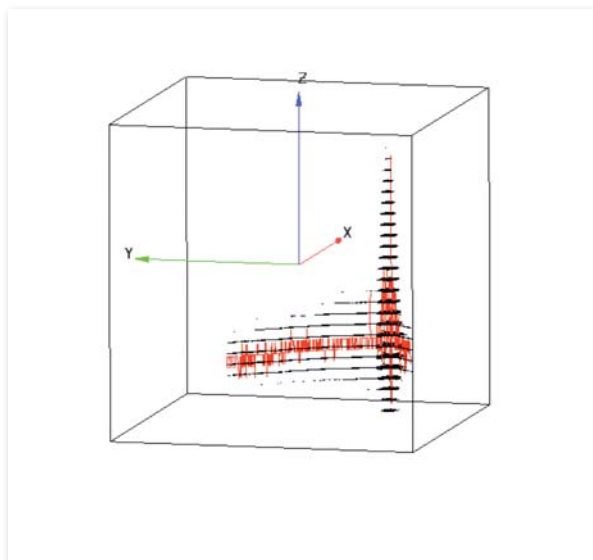
Op deze intermediaire *wave* kon de functie *ImageTransform Skeleton2* uitgevoerd worden. Het bleek dat de functie enkel 3D-*waves* aanvaardt en geen 2D-*waves*. Aangezien *Skeleton2* nog niet is opgenomen in Igor is deze functie ook nog niet gedocumenteerd. De uitvoer is een 3D-*wave* met een ternaire structuur (0,1 en 2) die het oppervlak weergeeft met waarde 2 en de bulk met waarde 1 (Figuur 6 - 2).

Met de */skpa* optie (*Skeletonpath*) werd het eindresultaat bekomen: een 1D-pad dat door de 3D-ruimte loopt in de kern van de uitlopers (Figuur 6 - 3). *Skeleton2*

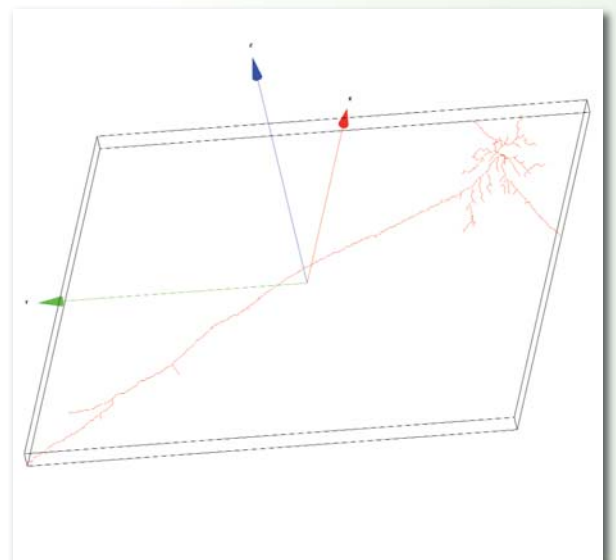
genereert een $N \times 3$ matrix die in de kolommen de x, y en z -coördinaten bevat van de punten van het pad waartussen lineair geïnterpoleerd wordt. De informatie in de matrix beschrijft verschillende segmenten van het pad zodat ook in zijtakken een pad kan voorzien worden. Het pad volgde goed de uitlopers, zeker wanneer het geëvalueerd werd in een z -projectie (bovenaanzicht; Figuur 6 - 3B). In de z -richting zaten wel een reeks schommelingen, al blijft het pad binnen de zenuwvezel (Figuur 6 - 3A). Op dit ogenblik is het moeilijk te beoordelen of dit een groot nadeel is aangezien dit zal afhangen van de toepassing van de gebruiker. De gegevens en resultaten werden naar Wavemetrics gestuurd.



Figuur 6 - 2: De uitvoer van *skeleton2* is een 3D-wave met een ternaire structuur (0,1 en 2) die het oppervlak weergeeft met waarde 2 (rood) en de bulk met waarde 1 (zwart).



Figuur 6 - 3A: Resultaat van *Skeleton2/skpa*. In 3 dimensies vallen de variaties in de z -richting op.



Figuur 6 - 3B: Resultaat van *Skeleton2/skpa*. (quasi) z -projectie toont goede resultaten in het xy -vlak.

6.3 Algoritme

6.3.1 Principe

De programmeermogelijkheden van Igor werden aangewend voor het ontwikkelen van een algoritme voor de semi-automatische detectie van de sporen in de tijd/ruimte-kaarten van de transportanalyse (bijlage C.3). Het betreft

semi-automatische detectie omdat de gebruiker handmatig de cursoren A en B op het begin- en eindpunt van het spoor plaats waarna het spoor automatisch tussen beide cursoren gedetecteerd wordt. Het basisprincipe van het algoritme is het volgen van de maximale intensiteit bij een lineaire progressie volgens de tijds-as. Het principe is te vergelijken met het wandelen over een bergtop waarbij steeds het hoogste punt wordt gezocht voor het uitstippen van het pad. Aangezien *MitoTracker Green* preferentieel in de mitochondriën accumuleert, is de fluorescentie-intensiteit de link tussen de fysieke locatie van een mitochondrion en de pixeldata in de software. Dit rechtvaardigt het gebruik van de intensiteit als primair principe bij de ontwikkeling van het algoritme. Er wordt verondersteld dat de oplossing van de probleemstelling, het vinden van een pad tussen A en B, uniek is. Op basis daarvan wordt het resulterende maximale-intensiteitspad van A naar B gecombineerd met dat van B naar A. Gemeenschappelijke punten blijven behouden. Ertussen worden equidistante interpolatiepunten toegevoegd als gemiddelde tussen de oplossing van A naar B en die van B naar A. Tussen elke cursor en het dichtstbijzijnde gemeenschappelijke punt wordt de oplossing genomen die vanuit deze cursor ontsproten is, zodat de eindoplossing vertrekt en eindigt in een cursor.

6.3.2 Uitwerking en implementering

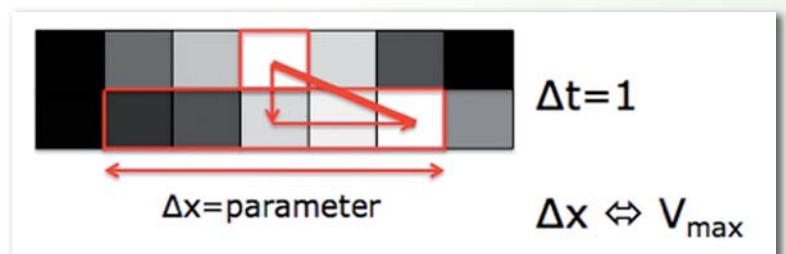
Er werd beslist een eigen algoritme uit te werken waarvan de functionaliteit en toepasbaarheid binnen het kader van mitochondriale transportanalyse gegarandeerd zou zijn. Het detectiealgoritme heeft een hele evolutie door gemaakt. Tijdens deze evolutie ontstond de uiteindelijke functie uit verschillende voorgangers. Vaak gaat het bij de overgang naar een volgende functie om uitbreidingen, maar evenzeer zijn er wijzigingen en abstractie doorgevoerd.

De allereerste functie, *path3*, was een basisuitwerking van het primaire principe: het volgen van maximale intensiteit. De functie heeft als argument een 2D-*wave*, namelijk een beeld opgenomen door een camera of een tijd/ruimte-kaart. Er werd gebruik gemaakt van slechts één cursor A die de gebruiker bovenaan de kaart dient te plaatsen waar het spoor begint. x en y coördina-

ten zullen worden bijgehouden in een $N \times 2$ *wave* (xy-data). Er werd iteratief een stap neerwaarts uitgevoerd waarbij vertrekkend van het vorige geregistreerde punt, het punt met maximale intensiteit uit drie horizontale naburige punten geregistreerd werd. Hier werd gewerkt met *if-elseif* uitdrukkingen die voor elke horizontale pixelrij de maximale intensiteitswaarde selecteren. Dit proces gaat door tot de onderste pixelrij van de ingevoerde 2D-*wave*. Daarna wordt het pad rudimentair op de afbeelding getekend en worden de assen geschaald zodat de schaal van het spoor dezelfde is als de schaal van de afbeelding. De schaal van de assen is zoals in de code te lezen hard gecodeerd, waaruit blijkt dat deze functie een testfunctie was en geen eindproduct. Finaal wordt aan de *output*, die de coördinaten van het pad bevat, een naam gegeven met een conditionele for-lus gecombineerd met een *waveExists* functie, wat ervoor zorgt dat de naam uniek is.

De volgende functie is een uitbreiding van vorige functie en heet *path5*. Net als de eerste functie heeft *path5* een 2D-*wave* als argument. De uitbreiding bestaat erin dat bij elke neerwaartse stap vijf pixels in plaats van drie in de horizontale richting vergeleken worden (Figuur 6 - 4). Dit werd iets overzichtelijker geprogrammeerd door de vijf naburige pixels op te slaan in de generieke variabelen a, b, c, d en e. Daardoor is dit algoritme ook iets sneller omdat niet steeds de te vergelijken waarden moeten worden opgezocht. Verder werden een aantal *elseif* uitdrukkingen uitgespaard door de ‘groter of gelijk aan’ operator in plaats van de ‘groter dan’ en ‘is gelijk aan’ operatoren afzonderlijk te gebruiken.

Uit vorige functies bleek dat er nood was aan een variabel aantal pixels in horizontale richting. In de derde functie *pathN* werd hiervan abstractie gemaakt en werd dit aantal als extra argument gebruikt. Deze functie heeft dus twee argumenten: de invoer *wave* en het aantal horizontale pixels waarover het algoritme mag



Figuur 6 - 4: *Path5* zoekt het maximum over vijf pixels centraal onder de eerder gedetecteerde pixel.

zoeken naar maximale intensiteit. Deze aanpak is abstracter en verhindert daardoor het gebruik van *if-elseif* uitdrukkingen voor de selectie van het maximum aangezien het aantal te vergelijken waarden niet a priori gekend is. Een aantal extra variabelen waren dan ook nodig. Zo worden de pixelwaarden van de te vergelijken pixels opgeslagen in een $N \times 1$ *wave* (vector) met N het argument van de functie. Deze *wave* is het onderwerp van de standaard Igor operatie *wavestats* die automatisch de locatie en waarde van de pixel met maximale intensiteit vindt. De uitvoer *wave* kreeg opnieuw een unieke naam en de tijdelijke generieke *wave* met N pixels werd verwijderd. Nieuw aan deze derde functie was dat de intensiteitswaarde ook werd opgeslagen naast de coördinaten van het pad. Deze intensiteitswaarden kunnen later gebruikt worden om de efficiëntie van het algoritme te verhogen.

De volgende functie *limitedpathN* is ontstaan uit de vorige met de toevoeging dat ook aanduiding van sporen met beperkte lengte, die niet tot het einde van de kaart lopen, mogelijk moet zijn. Om die reden werd nog een extra argument aan de functie toegevoegd namelijk de gewenste lengte van het pad. *limitedpathN* was exact dezelfde functie als *pathN* waarbij nu echter het aantal neerwaartse stappen (tijdstappen in een tijd/ruimte-kaart) beperkt werd door de vooraf opgegeven lengte.

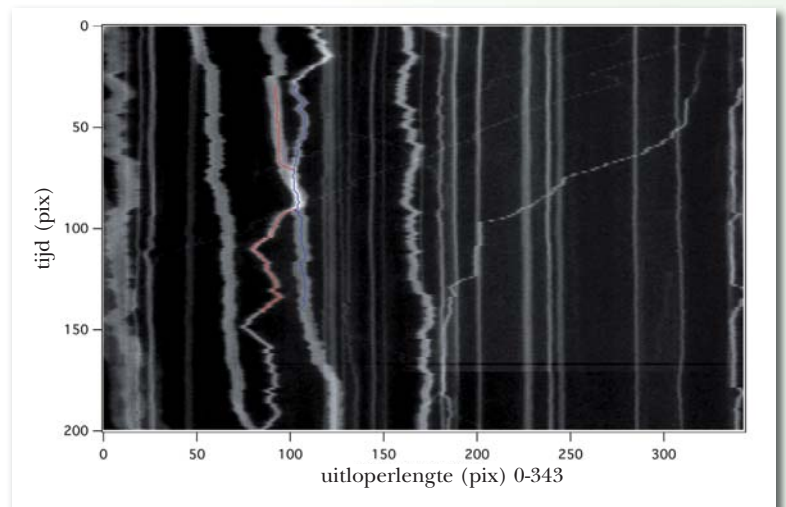
Deze vier functies waren de basis voor de finale functie *interpath* die gebruikt wordt via de nieuwe interface (zie 6.4). *Interpath* is dan ook een heel stuk uitgebreider en aanvaardt zeven argumenten. Het eerste argument is de 2D-*wave*, het beeld waarop gewerkt wordt. Daarna volgen vijf argumenten die de waarden bevatten van de instellingen waarmee de gebruiker het resultaat van de functie kan beïnvloeden. Het laatste argument is opnieuw het aantal horizontale pixels waaruit het maximum geselecteerd wordt. Dit argument is optioneel omdat *interpath* ook toelaat dit automatisch te kiezen (zie 6.3.3). Deze functie zoekt een pad tussen twee cursoren A en B die de gebruiker op het beeld plaatst. De coördinaten van beide cursoren worden geregistreerd en er wordt bepaald welke de bovenste en welke de onderste cursor is. De gebruiker kan dus zowel cursor A bovenaan als onderaan plaatsen. Daarna

wordt de parameter die het aantal pixels aangeeft waarbinnen het maximum gezocht wordt, berekend indien deze niet door de gebruiker is vastgelegd. De parameter wordt berekend uit de richtingscoëfficiënt van de rechte tussen cursor A en B en wordt omgezet naar een oneven waarde wanneer een even waarde zou resulteren zodat er steeds een pixel is die zich centraal bevindt. Het resultaat wordt dan aan de gebruiker getoond via een uitvoervensterje.

Volledig volgens het principe van de oorspronkelijke functies wordt een spoor geregistreerd van de bovenste cursor naar de pixelrij van de onderste en een van de onderste cursor naar de pixelrij van de bovenste (Figuur 6-5). Door het verschil van beide paden te nemen, worden daarna de gemeenschappelijke punten gevonden. Worden er geen gemeenschappelijke punten gevonden, dan stopt de functie en geeft deze boodschap door aan de oproepende functie die deze feedback zal gebruiken om eventueel een nieuwe poging te ondernemen.

De stukken pad tussen de cursor en het dichtstbijzijnde gemeenschappelijke punt worden gecombineerd met de gemeenschappelijke punten om zo een pad te vormen dat van cursor A naar B gaat. Om opnieuw één punt

per pixelrij te bekomen worden punten toegevoegd tussen de gemeenschappelijke punten via interpolatie. Dit is nodig voor de goede werking van operaties die de gebruiker ter beschikking heeft, zoals hersamplen. Daarna volgt de uitvoering van een reeks operaties waarvan de gebruiker de instellingen bepaald heeft. Eerst wordt het voortschrijdend gemiddelde uitgevoerd, daarna wordt hersampled en geïnterpoleerd (zie 6.3.3). Daarbij wordt een extra bewerking uitgevoerd die ervoor zorgt dat de start- en eindpunten van het pad gegarandeerd blijven. Finaal wordt het verkregen pad doorgegeven aan de functie *portautotrace* die dit resultaat integreert in het bestaande *framework*.

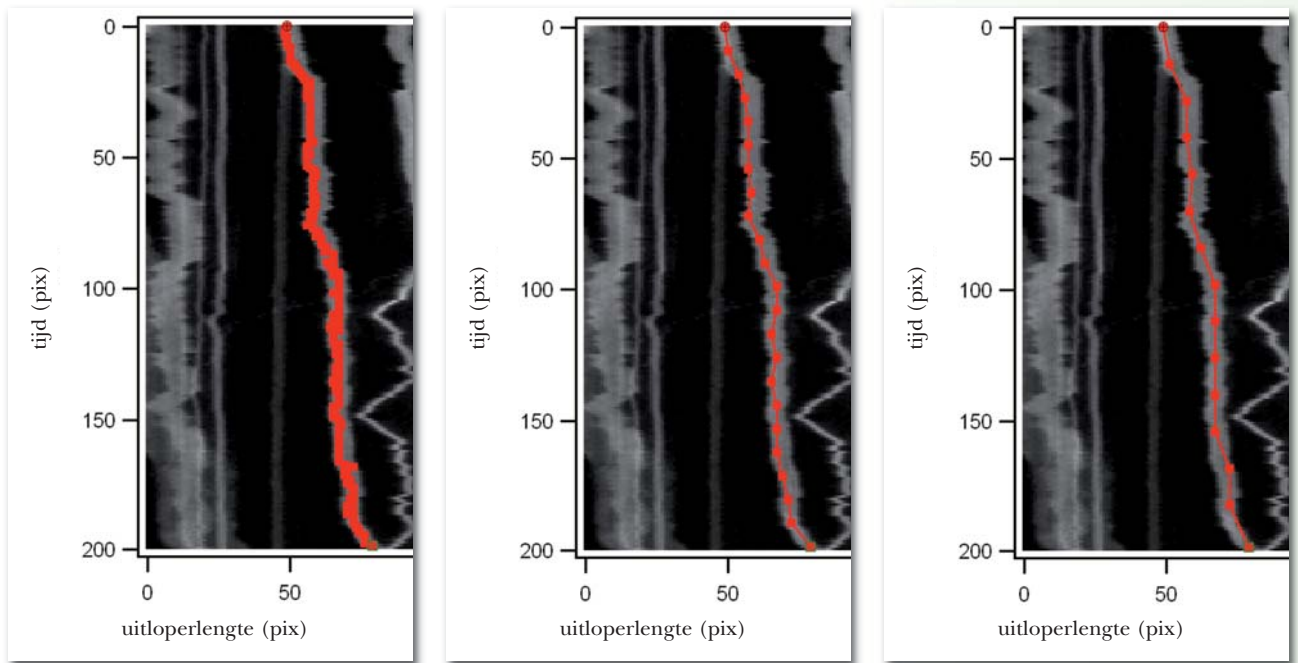


Figuur 6-5: Een spoor wordt geregistreerd van de bovenste cursor naar de pixelrij van de onderste (rood) en een van de onderste cursor naar de pixelrij van de bovenste (blauw).

6.3.3 Adaptatieparameters en opties

Verschillende adaptatieparameters werden geïmplementeerd zodat de gebruiker het pad van de semi-automatische methode kan wijzigen. De eerste parameter kan een preparameter genoemd worden omdat deze gebruikt wordt tijdens het uitvoeren van de spoorselectie. Het is de parameter die het aantal pixels bepaalt waarover de maximumintensiteit gezocht wordt in horizontale richting. Dit aantal pixels bepaalt ook de maximale hoek van het pad aangezien de tangens van deze hoek bepaald wordt door het aantal pixels in horizontale richting. De maximale hoek bepaalt op zijn beurt de maximale snelheid die uit de analyse van het pad kan volgen. Het *popup* menu om deze parameter te wijzigen staat naast de knop die het semi-automatische algoritme uitvoert omdat deze parameter als preparameter, anders dan de andere, noodzakelijk een waarde moet hebben voor uitvoering van het algoritme. Een eerste mogelijkheid voor het instellen van deze parameter is 'automatisch'. Het algoritme kiest dan zelf een waarde (zie 6.3.2) en bovendien ondersteunt deze instelling dat gezocht wordt over verschillende waarden tot een spoor gevonden wordt (zie terugkeerwaarde onder 6.4). De gebruiker kan ook zelf een vaste waarde kiezen. Zo kan hij de waarde op 0° instellen wanneer hij vaststelt dat het om een stationair mitochondrion gaat of kan hij 45° (3 pixels) verkiezen om zeker te zijn dat het automatische pad niet ver zal uitwijken wanneer hij vaststelt dat dat voor het mitochondrion ook het geval niet is. Bij een heel snel mitochondrion kiest de gebruiker beter een hogere waarde of voor automatische instelling zodat een hoge waarde zal gebruikt worden. Wanneer scherpe hoeken en daardoor grote snelheidsveranderingen waargenomen worden, kiest de gebruiker best een gemiddeld tot hoge waarde.

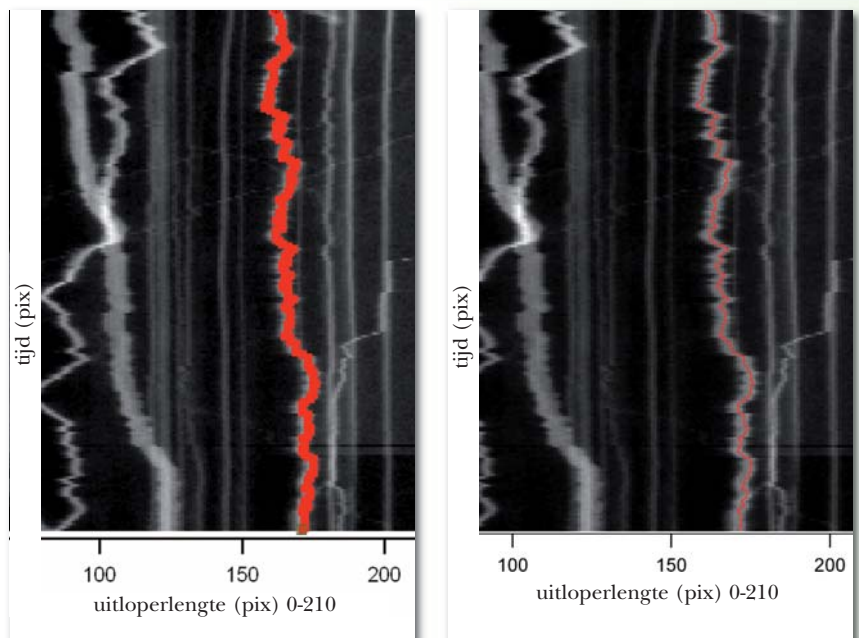
De andere parameters zijn eerder postparameters: ze bewerken het oorspronkelijk bekomen pad. Met een eerste set kan het pad hersampled worden door opgave van een samplefactor en interpolatiefactor (Figuur 6 - 6). De verhouding van deze parameters zal het aantal punten over het pad bepalen en zo meer of minder details weergeven. Daarbij hoort ook de mogelijkheid om vergladding toe te passen volgens verschillende formules. Wanneer bijvoorbeeld het gemiddelde gekozen wordt, zijn de overblijvende punten het



Figuur 6 - 6: Hersamplen van het verkregen pad.

gemiddelde van wat werd weggelaten. Dit is een methode om bij de reductie van punten toch nog informatie bij te houden over punten die weggelaten worden.

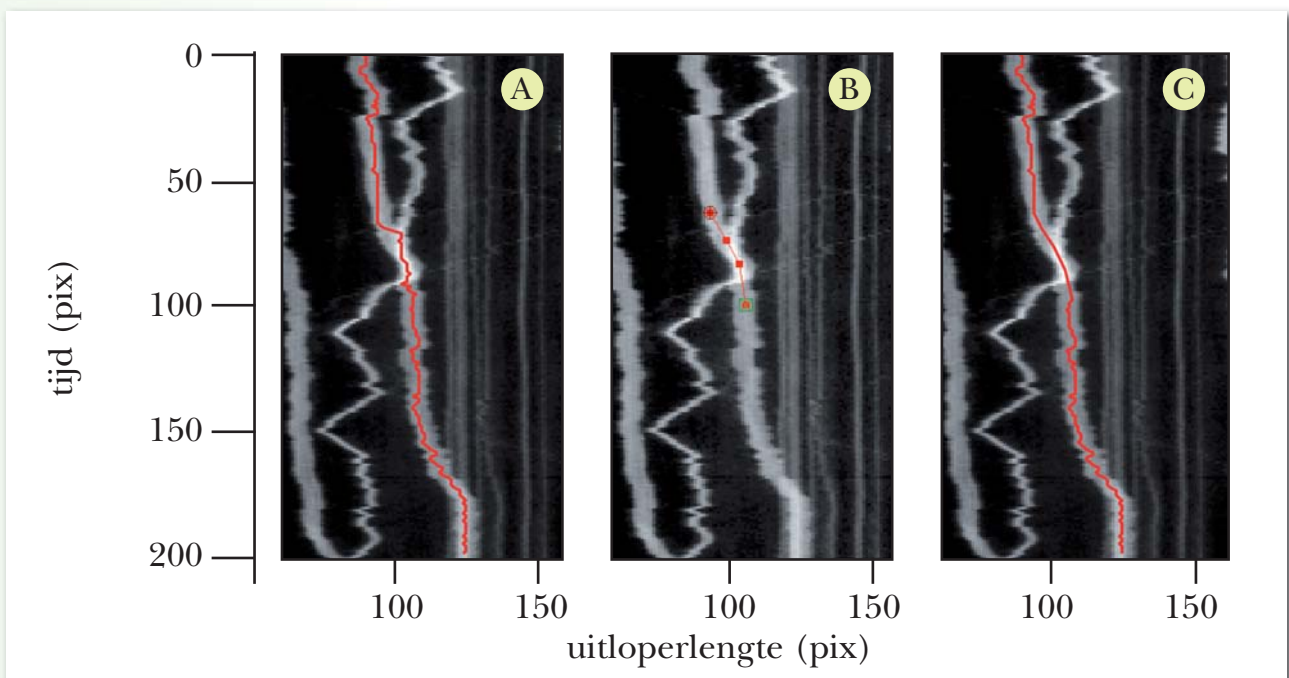
Een tweede set parameters bepaalt de instellingen van een voortschrijdend gemiddelde dat uitgevoerd wordt op het verkregen pad. Zowel het bereik van het gemiddelde als de iteratie van het voortschrijdend gemiddelde over het pad kan ingesteld worden. Verder zijn er nog twee speciale opties. De optie 'auto finish' zorgt dat na het automatisch tekenen van het pad de *edit-mode* automatisch verlaten wordt (Figuur 6 - 7). Daardoor kan de gebruiker het resultaat sneller beoordelen. In de *edit-mode* worden



Figuur 6 - 7: De optie 'auto finish' laat toe automatisch de edit-mode te verlaten na automatische markering van het spoor zodat het detail van het pad beter beoordeeld kan worden.

namelijk grote punten weergeven die het pad bepalen en aangezien er heel veel zijn, verbergen deze punten het detail van het pad. Deze optie helpt om meteen het resultaat te beoordelen en eventuele aanpassingen door te voeren. Indien het pad goed is kan het meteen opgeslagen worden en is opnieuw tijd bespaard.

Een laatste optie laat toe om een automatisch getekend pad lokaal te wijzigen (Figuur 6 - 8). Voorgaande parameters hadden namelijk effect over heel het pad terwijl zich situaties kunnen voordoen waar enkel over een beperkt stuk aanpassingen nodig zijn. De gebruiker kan dan met beide cursoren het stuk van het pad aanduiden dat aangepast dient te worden en 'edit local' aanvinken. Het oorspronkelijke pad wordt opgeslagen en de gebruiker kan alle parameters (hersamplen, voortschrijdend gemiddelde, andere preparameter,...) toepassen op het lokale partiële pad. Wanneer 'edit local' wordt uitgevinkt wordt de aanpassing opgenomen in het oorspronkelijke pad waarna het bewaard kan worden.



Figuur 6 - 8: De optie 'edit local' laat toe manuele en automatische correcties uit te voeren over een lokaal spoor. A. oorspronkelijk pad, B. lokale aanpassing, C. implementatie van de lokale aanpassing.

6.4 Interface

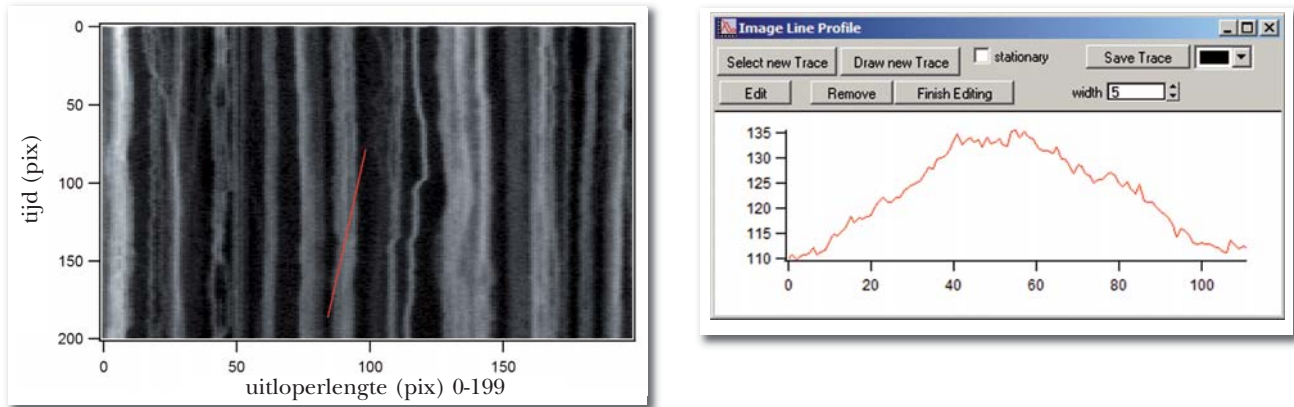
6.4.1 Grafische gebruikersinterface (*graphical user interface: GUI*)

Een GUI werd ontwikkeld om het algoritme en zijn adaptatieparameters eenvoudig toegankelijk te maken voor elke gebruiker (Figuur 6 - 9). Hiervoor werd het bestaande controlevenster gereorganiseerd: de knoppen werden georganiseerd in groepen die samenvallen met de stappen die doorlopen dienen te worden tijdens de analyse namelijk *new trace*, *editing* en *saving*. Er werden nieuwe knoppen, aanvinkvakjes, *popup*menu's, parameteruitvoer -en invoervensters voorzien voor het nieuwe algoritme en de bijhorende parameters en opties. Inwendig werd de code ook gestructureerd per onderdeel net zoals de GUI. Elk interface-element (knop, aanvinkvakje, ...) werd functioneel gemaakt door de koppeling met een eigen interfacefunctie (bijlage C.4).

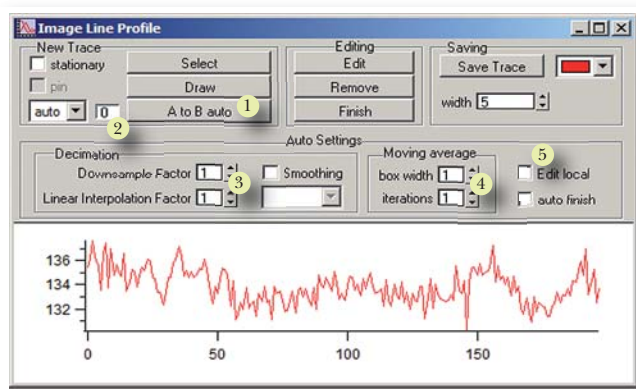
6.4.2 Interfacefuncties

Een interfacefunctie regelt de GUI, geeft parameters door en manipuleert invoer en uitvoer naar en van de achterliggende functies die het rekenwerk doen en waar de gebruiker geen rechtstreekse controle over heeft. De functie verbonden aan de belangrijkste knop 'A to B auto' zorgt ervoor dat alle parameters worden opgehaald en doorgegeven aan de functie *interpath* die het ontwikkelde algoritme uitvoert. Deze interfacefunctie zorgt ook voor extra persistentie van het algoritme in het geval dat de preparameter op automatisch is ingesteld. Er wordt namelijk een terugkeerwaarde (*return value*) opgevangen als feedback op de poging tot oplossing. Wanneer uit de terugkeerwaarde blijkt dat er geen oplossing gevonden is, namelijk dat er geen pad kon gevonden worden omdat er geen enkel gemeenschappelijk punt gevonden werd in het opwaarts en neerwaarts zoekproces, zal een nieuwe poging ondernomen worden met een grotere preparameter. Dit feedbackproces kan tot 50 maal uitgevoerd worden. Wanneer door de gebruiker een waarde anders dan 'auto' voor de preparameter ingesteld wordt, zal dit feedbackmechanisme niet in werking treden omdat de waarde als vast beschouwd wordt en het tot verwarring kan leiden wanneer de preparameter automatisch een andere waarde krijgt dan door de gebruiker was opgegeven. Een melding "To

hard to extract a trace.” zal door deze functie gegenereerd worden wanneer geen oplossing bekomen werd, hetzij na meer dan 50 keer doorlopen van de feedback, hetzij na een mislukte poging met vast ingestelde preparameter. De interfacefunctie verbonden aan de preparameter voor maximale snel-



Figuur 6 - 9: A. Oorspronkelijke controleinterface met bijhorende tijd/ruimte-kaart die de weergave van het intensiteitsprofiel in het controlevenster verduidelijkt.



Figuur 6 - 9: B. De controleinterface voor het semi-automatische algoritme. 1. Autodetectie uitvoeren. 2. Aantal horizontale pixels. 3. Hersampleparameters. 4. Parameters voor het voortschrijdend gemiddelde. 5. 'Edit local'.

heid/hoeck geeft het overeenkomstig aantal pixels in horizontale richting weer in een uitvoervenstertje er vlak naast (Figuur 6 - 9B). Wanneer deze op 'auto' ingesteld wordt, zal de door de computer gebruikte waarde getoond worden na de uitvoering van het algoritme.

Bij het aanvinken van 'smoothing' bij het onderdeel 'decimation' zal door de bijhorende interfacefunctie het *popup* menu voor keuze van de *smoothing* methode beschikbaar ge-

maakt worden. Omgekeerd zal het menu opnieuw onbeschikbaar worden bij uitvinken. Of er *smoothing* moet uitgevoerd worden of niet zal niet door deze interfacefunctie geregeld worden maar dit zal, zoals hiervoor vermeld, opgehaald worden door de 'A to B auto' interfacefunctie die het doorgeeft aan de functie die het detectiealgoritme bevat namelijk *interpath*.

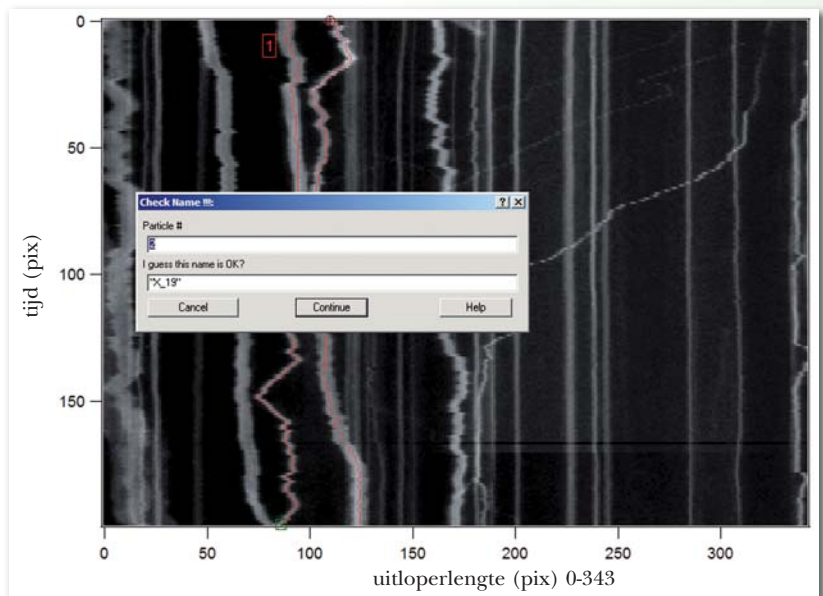
De optie 'edit local' is geen parameter voor adaptatie van het gedetecteerde

pad, maar een optie die intermediaire bewerkingen op een reeds gedetecteerd pad toelaat (zie 6.3.3).

6.4.3 Sneller opslaan

Aangezien heel veel verschillende mitochondriën geanalyseerd moeten worden nog vóór statistische verwerking kan veel tijd bespaard worden wanneer de analysetijd van een enkel mitochondrion ingekort wordt. Enerzijds werd hiervoor het semi-automatisch detectie algoritme ontwikkeld, anderzijds werd de procedure voor bewaren van het pad geoptimaliseerd. Wanneer de gebruiker het pad bewaart, moet een unieke naam opgegeven worden en wordt een naam gesuggereerd gebaseerd op de naam van het opnamebeeld, de naam van de uitloper en de uitloperlengte. Dit werd uitgebreid met een geheugen zodat bij een volgende suggestie de aanpassingen van de vorige naam inbegrepen is. Bij het eerste mitochondrion van een nieuwe kaart, wordt opnieuw een unieke naam gesuggereerd.

Ook werd het systeem aangepast zodat automatisch een uniek nummer voor het mitochondrion wordt gesuggereerd (Figuur 6 - 10). Hierbij wordt een logische volgorde aangehouden startend van nul en verhoogd met één voor elk nieuw mitochondrion. Telkens wordt gecontroleerd of een mitochondrion met dit nummer reeds bestaat. Indien dit het geval is, wordt een volgend nummer genomen en gecontroleerd (bijlage C.5). Het resultaat van deze bewerkingen op de bewaarprocedure is dat de gebruiker niet meer bij elk mitochondrion de aanpassingen opnieuw moet invoeren en geen mitochondriën meer moet tellen om het volgnummer te kennen. Indien de gebruiker de naam wil aanpassen is dit ook steeds mogelijk.

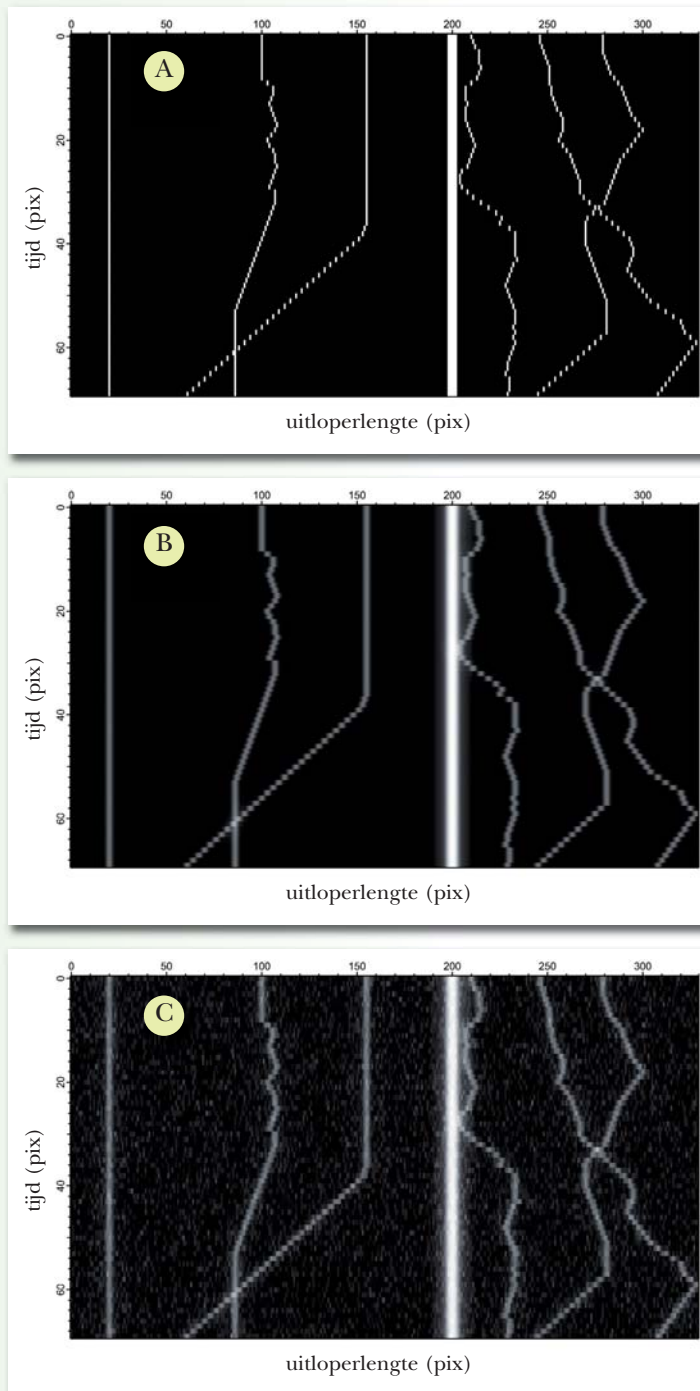


Figuur 6 - 10: Een uniek volgnummer wordt automatisch gesuggereerd en aanpassingen aan de naam worden bewaard voor volgende naamsuggestie.

6.5 Evaluatie

6.5.1 Benchmark

Om het algoritme te evalueren werd een test opgesteld om de mogelijke winst in accuraatheid en tijd in te schatten. Er werd een theoretische tijd/ruimtekaart ontwikkeld met zeven artificiële mitochondriale sporen (Figuur 6 -



Figuur 6 - 11: Artificiële tijd/ruimte-kaarten. A. Ideaal. B. Geconvolveerd met een PSF. C. Ruis toegevoegd.

11A). Deze kaart werd geconvolveerd met een *point spread function* en Gauss verdeelde ruis werd toegevoegd (Figuur 6 - 11B,C). De gemiddelde intensiteit van de ruis bedroeg 25 en de maximale ruiswaarde bedroeg 131 ten opzichte van het mitochondriaal signaal van 200. Vijf personen ervaren in het gebruik van de software hebben de mitochondriën aangeduid met gebruik van de oorspronkelijke manuele *tools*. De mitochondriën werden ook éénmaal aangeduid met de semi-automatische *tool* waarbij enkel de preparameter werd gebruikt en éénmaal met de automatische *tool* waarbij alle nieuwe *tools* gebruikt werden.

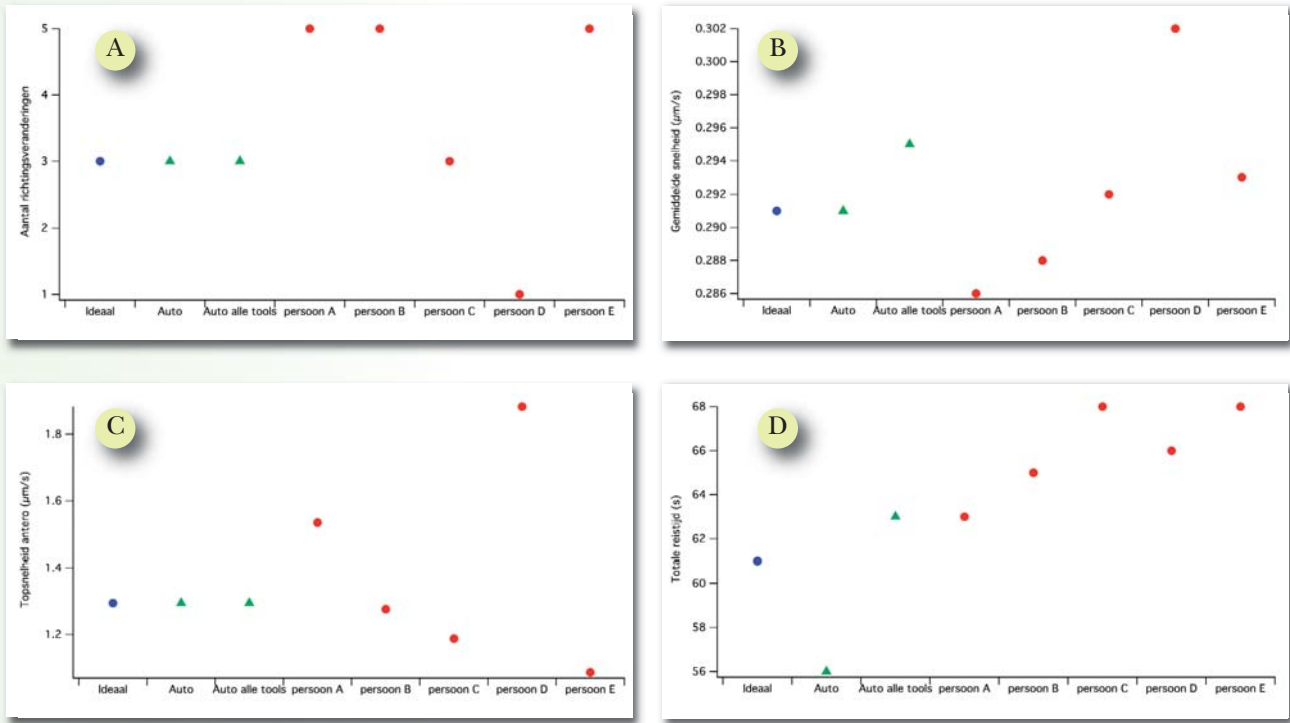
De ideale, theoretische kaart werd ook geanalyseerd, waarna de waarden van de zeven testen werden vergeleken met de ideale waarden. Hiervoor werd het absolute verschil berekend tussen elke waarde en de ideale waarde en verzameld per mitochondrion per test in een tabel (bijlage C.6). Er werd ook een gemiddelde genomen van deze foutwaarden per mitochondrion en een gemiddelde per para-

meter. Daarvan werd nog eens het gemiddelde genomen als maat voor de juistheid van aanduiding. Deze gemiddelden hebben geen betekenis op zich, maar kunnen wel vergeleken worden tussen de zeven testen onderling. Hierna volgen deze resulterende gemiddelden en de tijdsduur om de markeringen te doen (Tabel 6 - 1).

	Gemiddelde fout (ongedef. eenheid)	Duur
Persoon A	0,27	6 min 48 s
Persoon B	0,46	4 min 31 s
Persoon C	0,49	7 min 10 s
Auto (alle <i>tools</i>)	0,50	4 min 20 s
Persoon D	0,52	7 min 49 s
Auto (enkel preparameter)	0,64	2 min 47 s
Persoon E	0,69	6 min 44 s

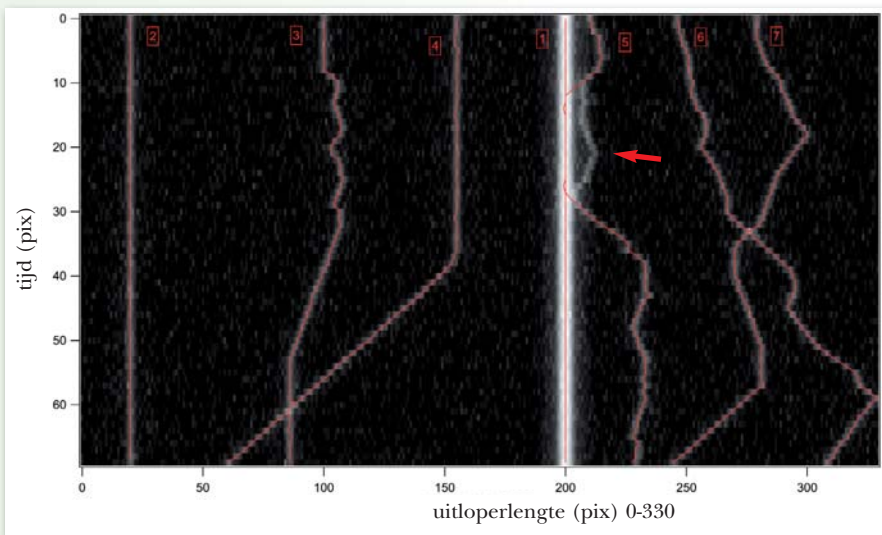
Tabel 6 - 1: Gemiddelde fout en duur van markering voor elk van de zeven testen.

Uit deze gegevens blijkt zoals verwacht dat de duur van de markering drastisch (tot 50 % tijdswinst) verminderd wordt door gebruik van de automatische markering. Voor een analyse als deze uit hoofdstuk 4 met een 400-tal mitochondriën betekent dit al vlug een tijdswinst van 2,5 à 3 uur. Wanneer echter meer tussenkomst van de gebruiker vereist is (auto met alle *tools*) dan stijgt de aanduidtijd. Op gebied van nauwkeurigheid presteert de automatische *tool* zoals een gemiddelde ervaren gebruiker. Wanneer resulterende waarden van een aantal parameters van de ‘meer bewegende’ artificiële mitochondriën (hier nummer 5 en 6) worden vergeleken, behaalt het algoritme goede resultaten (Figuur 6 - 12).



Figuur 6 - 12: Vergelijking van enkele parameters voor de zeven testen op een ‘meer bewegend’ mitochondrion nummer 6 (A,B,C). D. Onderschatting van de totale reistijd door overspringen van mitochondrion nummer 5 op het spoor van een stationair mitochondrion. Correctie met *tools* biedt een oplossing.

De gemiddelde fout van de automatische markering waarbij enkel de preparateur gebruikt werd, kon verbeterd worden tot 0,48 door mitochondrion 5



Figuur 6 - 13: Het detectiealgoritme gaat in de fout door over te springen op een naburig mitochondrion van hogere intensiteit. Gebruik van de optie ‘edit local’ kan hier een oplossing bieden.

eruit te laten waar het algoritme een duidelijke fout maakt (Figuur 6 - 13). De duur van de markering stijgt dan wel aangezien deze dan manueel of met de ‘edit local’ optie moet aangeduid worden.

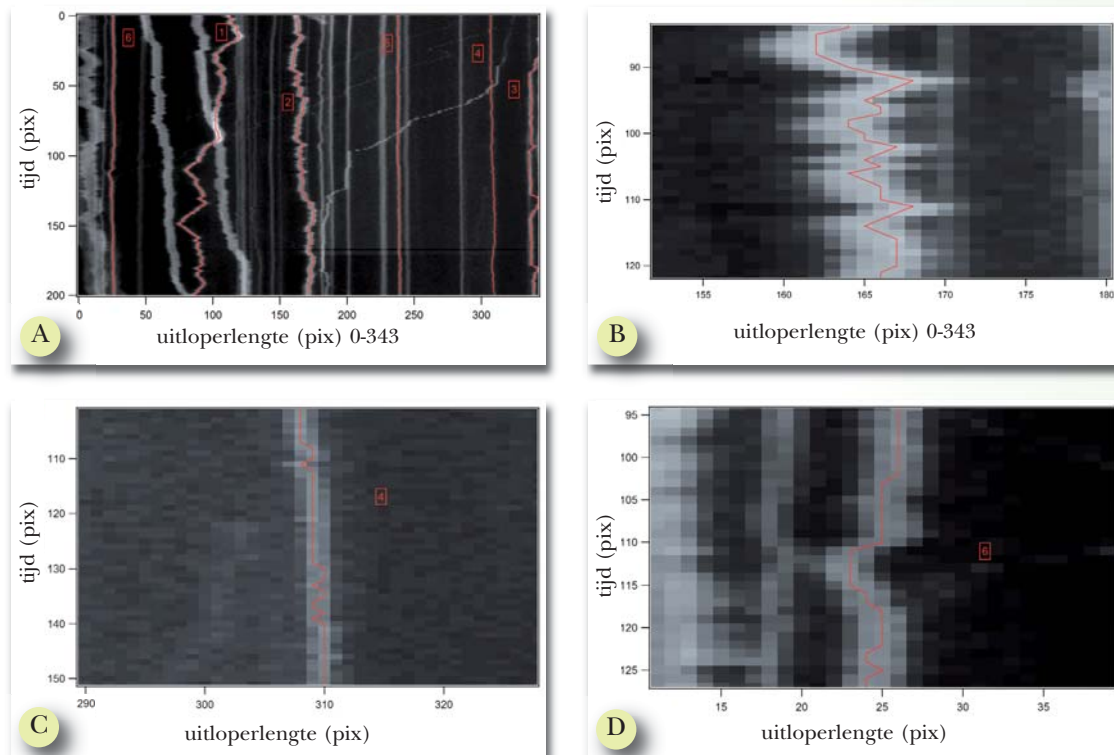
Ondanks dat deze test goede informatie biedt over het algoritme blijft het een theoretische setting.

Voor de ruis is een moeilijk gegeven. Bij vergelijken met echte kaarten zal opvallen dat de ruis daar

vaak een lager niveau heeft en dat waar intensiteiten van ruis in de theoretische kaarten het algoritme zullen verstoren, er vanuit kan gegaan worden dat intensiteiten op of in de dichte omgeving van een mitochondrion geen ruis kunnen genoemd worden in echte kaarten maar afkomstig zijn van accumulatie van kleurstof op die specifieke plaats, namelijk in het mitochondrion. Het is dan eerder de specificiteit van de kleurstof voor het organel die de accuraatheid van het algoritme bepaalt. Met andere woorden elke hoge intensiteit, die geregistreerd wordt als deel van het pad is fysisch relevant omdat daar meer accumulatie van fluorescente kleurstof is, terwijl dit niet zo is bij de random verdeelde ruis in de theoretische kaarten. Anderzijds is er ook een bijdrage van de PSF die zowel in de theoretische als in de echte kaarten de goede werking het algoritme kan verstoren.

Dat het automatisch algoritme goede resultaten behaalt voor ‘meer bewege-
 nende’ mitochondriën bleek niet alleen uit de benchmark, maar ook uit de resulterende paden op kaarten van echte mitochondriën (Figuur 6 - 14A).

Op een kaart van goede kwaliteit kan het algoritme mitochondriën in detail

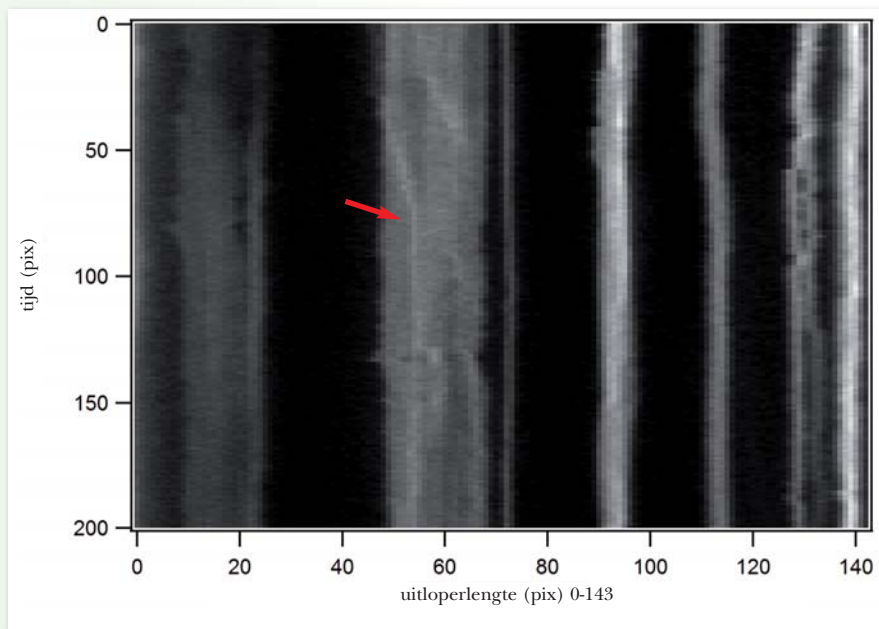


Figuur 6 - 14: A. Het automatisch algoritme haalt goede resultaten, in het bijzonder voor oscillerende mitochondriën. B,C,D. Details van enkele resulterende paden.

volgen die veel oscillerende bewegingen maken (Figuur 6 - 14B, C, D). Een dergelijk pad bevat ongetwijfeld meer detail dan een gemiddelde gebruiker zou aanduiden. In deze situaties is het algoritme dan ook van groot nut.

6.5.2 Troubleshooting

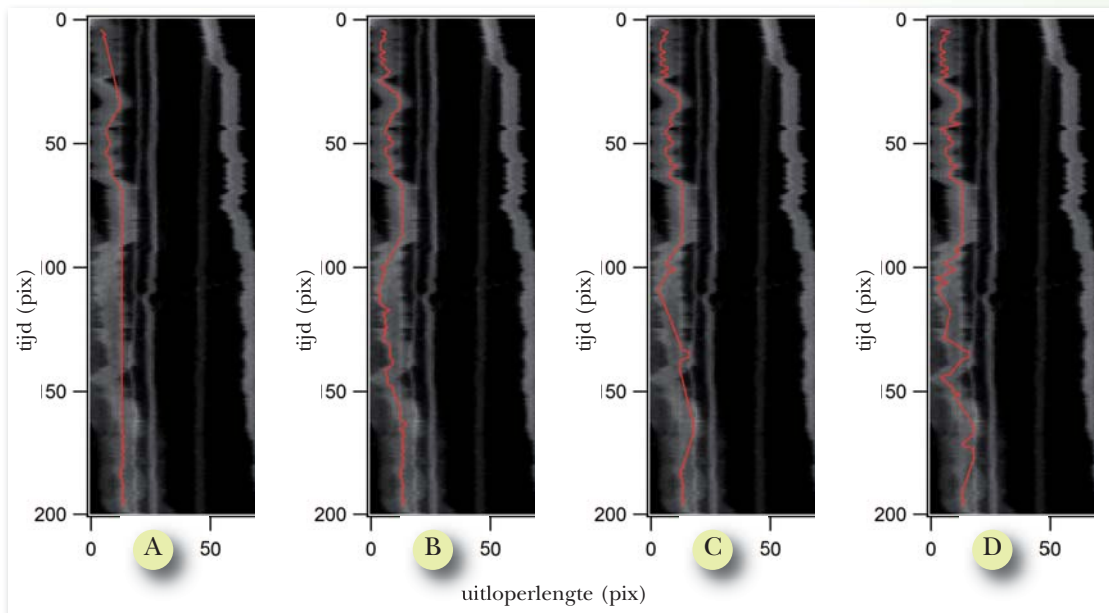
Er zijn echter een aantal moeilijkheden voor het automatisch algoritme die af en toe voorkomen. Deze hangen voornamelijk samen met onderscheidbaarheid van individuele mitochondriën. Ten eerste is een mitochondrion niet altijd eenduidig bepaald: soms overlappen signalen van verschillende mitochondriën (Figuur 6 - 15). Over de fysische betekenis hiervan kunnen geen uitspraken gedaan worden gezien het gebrek aan diepte-informatie van de *widefield* fluorescentieopnames. Aangezien het voor de menselijke interpretatie geen uitgemaakte zaak is waar een dergelijk mitochondrion zich dan juist bevindt, is het voor het algoritme al helemaal problematisch: het zal het pad van hoogste intensiteit volgen wat vaak overeenkomt met een overlappend mitochondrion, maar waarvan de beweging kan verschillen van het groter mitochondrion.



Figuur 6 - 15: Mitochondriale sporen die overlappen vormen een moeilijkheid voor het automatisch algoritme. Het pad van hoogste intensiteit wordt gevolgd dat vaak overeenkomt met het 'inwendige' spoor, maar dat niet noodzakelijk overeenkomt met het spoor van het grotere mitochondrion.

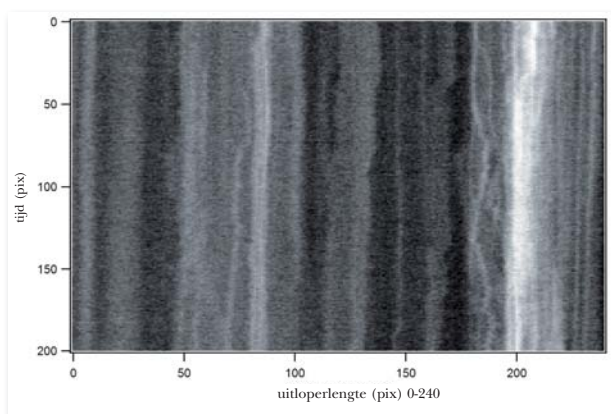
Ten tweede zijn sommige sporen omwille van hun breedte en intensiteit moeilijk te traceren (Figuur 6 - 16). Niet het minst omdat ze soms 'over' kleinere mitochondriën lopen die het algoritme 'afleiden'. Het pad is dan erg gevoelig voor verschillende waarden van de preparameter.

Een derde detectieprobleem treedt op wanneer er een zwak signaal van de kleuring is (veel ruis) en de

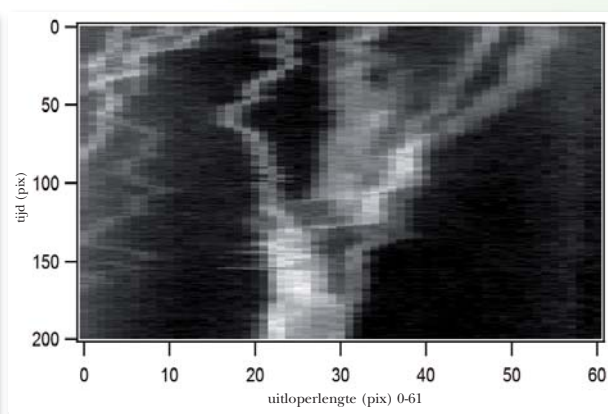


Figuur 6 - 16: Sommige sporen zijn omwille van hun breedte en intensiteit moeilijk te traceren. Het pad is dan erg gevoelig voor verschillende waarden van de preparameter. De preparameter is respectievelijk 3, 5, 7 en 9 horizontale pixels voor A, B, C en D.

mitochondriën zich niet duidelijk onderscheiden van elkaar of van de achtergrond (laag contrast) in de kaart (Figuur 6 - 17). Ook hier zou de menselijke interpretatie het moeilijk hebben, net zoals bij fusie of aggregatie waar het heel moeilijk is de mitochondriën te volgen tussen het moment waarop ze gescheiden zijn en het moment waarop ze een geheel vormen (Figuur 6 - 18). Het is duidelijk dat de kwaliteit van de kaart belangrijk is voor het resultaat



Figuur 6 - 17: Een zwak signaal van de kleuring (veel ruis) en mitochondriën die zich niet duidelijk onderscheiden van elkaar of van de achtergrond (laag contrast) zijn een moeilijkheid voor het automatisch algoritme, net zoals dit voor de menselijke interpretatie een moeilijkheid is.

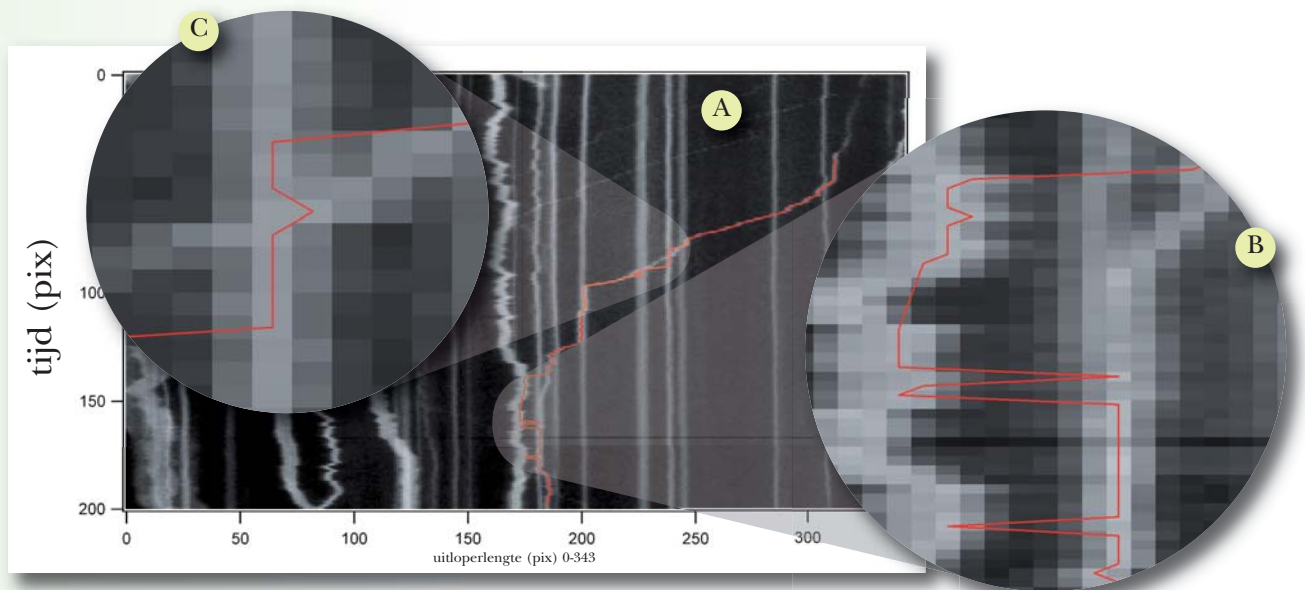


Figuur 6 - 18: Bij fusie of aggregatie is het heel moeilijk de mitochondriën te volgen tussen het moment waarop ze gescheiden zijn en het moment waarop ze een geheel vormen, zowel automatisch als manueel.

van de automatische *tool*. Deze kwaliteit wordt bepaald door alle stappen die aan de kaart voorafgaan zoals het maken van de celculturen, de kleuring, de beeldvorming en het aanduiden van de uitlopers (zie hoofdstuk 4).

Een vierde probleem zijn heel snel bewegende mitochondriën die in de buurt komen van mitochondriën met een hogere intensiteit (Figuur 6 - 19A). Gezien de parameter van maximale hoek groot is, kan het algoritme overspringen op het andere, meer intense pad (Figuur 6 - 19B). Een typische plaats waar een afwijking op het pad kan optreden, is een kruising met een ander mitochondrion (Figuur 6 - 19C).

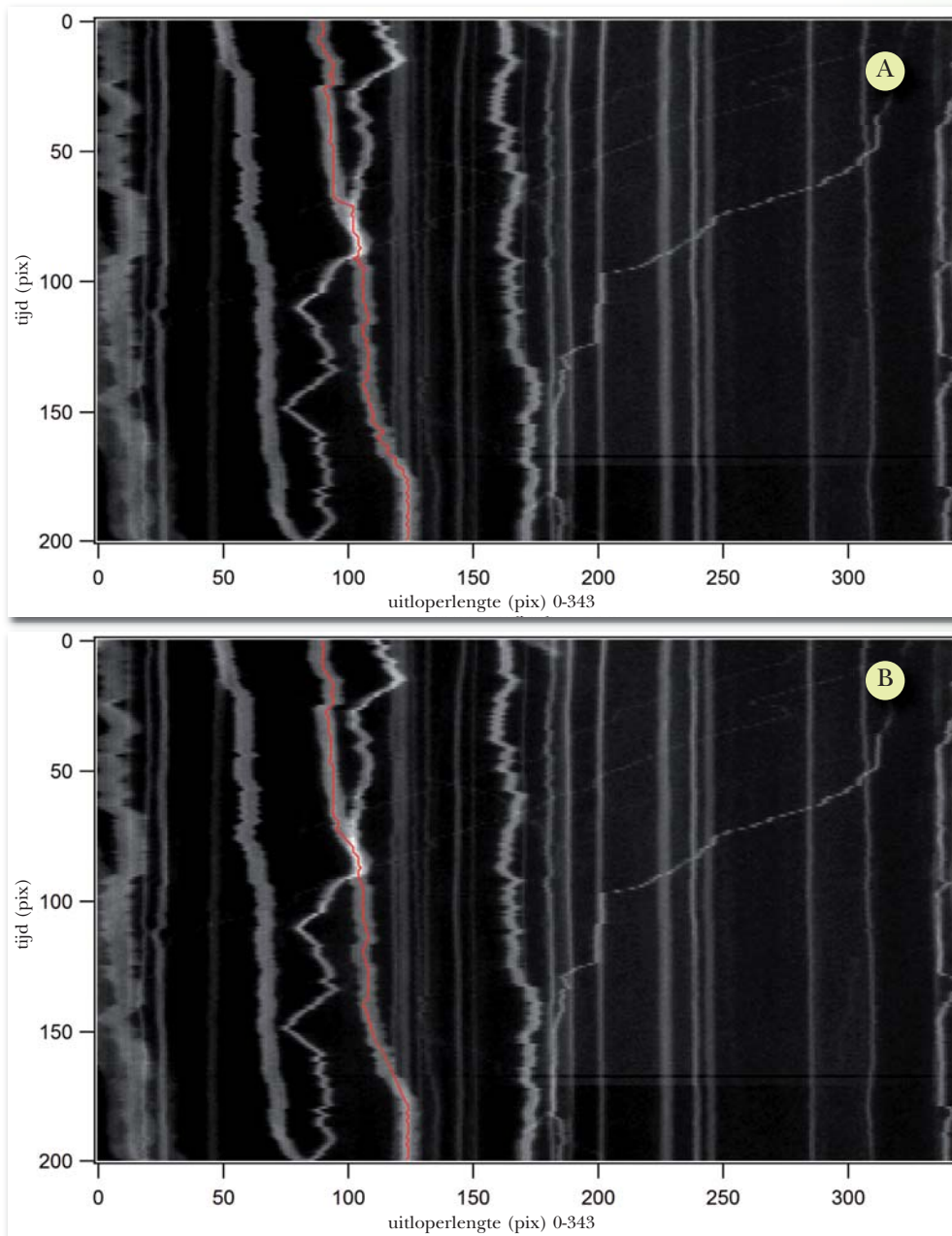
Wanneer het om een trager mitochondrion gaat kan de parameter voor maxi-



Figuur 6 - 19: Het algoritme kan overspringen naar naburige mitochondriale sporen wanneer deze een hogere intensiteit hebben en binnen de maximale hoek vallen die ingesteld werd. Dit kan voorkomen bij snel bewegende mitochondriën omdat de maximale hoek daar groter zal zijn.

male hoek globaal verlaagd worden (Figuur 6 - 20), terwijl bij snelle mitochondriën de maximale hoek lokaal kan aangepast worden. Een andere mogelijkheid is om het pad op de plaats van de afwijking te hersamplen tot slechts enkele punten om deze daarna handmatig te verplaatsen (Figuur 6 - 8).

Visuele evaluatie is belangrijk zowel voor het verbeteren van het algoritme als



Figuur 6 - 20: Het pad kan globaal aangepast worden door een kleinere preparameter in te stellen om overspring-effecten naar sporen van hogere intensiteit te vermijden.

A. Oorspronkelijk pad. B Kleinere preparameter.

voor correctie van eventuele foute aanduidingen bij het gebruik. Door het vaststellen van foute aanduidingen door het algoritme zal de gebruiker deze kunnen corrigeren en hij zal daardoor leren wanneer dit hulpmiddel het meest efficiënt werkt zodat het doelgericht ingezet kan worden. De ontwikkelaar zal via visuele evaluatie kunnen zien waar het fout loopt en het algo-

ritme kunnen aanpassen zodat steeds minder interactie van de gebruiker nodig is voor een maximale accuraatheid en een minimale analysetijd.

6.6 Perspectieven

Om het algoritme te verbeteren zijn er tal van mogelijkheden. Eén van de voornaamste zou een analyse van het breedteprofiel van een mitochondriaal spoor kunnen zijn. Daardoor zou ook informatie kunnen bijgehouden worden over de grootte van het mitochondrion. Fissie en fusie of kruisingen zouden gedetecteerd kunnen worden. Het gemiddelde van dit intensiteitsbreedteprofiel ($\sum [x_j \cdot I_j(x_j)]$) van het spoor zou kunnen gebruikt worden als punt voor het pad in plaats van het maximum, dat in het huidige algoritme gebruikt wordt, zodat het hele mitochondrion in rekening gebracht wordt voor zijn positiebepaling. Het overspringen naar een ander spoor zou zo vermeden kunnen worden. Wanneer informatie zoals hoeken, intensiteit en grootte van vorige punten van het pad worden bijgehouden, kunnen deze data actief gebruikt worden om tijdens de uitvoering van het algoritme te controleren welke stap de meest plausibele zou zijn. Verder zou het nog meer tijdsinstaat opleveren om te automatiseren op niveau van de volledige kaart en het algoritme zelf het aantal en de plaatsen van de mitochondriën te laten detecteren omdat dan met één klik een reeks verschillende mitochondriën gedetecteerd zouden worden. Het zou ook de implementatie vergemakkelijken van functies voor onderzoek naar verbanden tussen naburige mitochondriën. Wanneer 4D-data beschikbaar zijn, zou dit algoritme naar vier dimensies uitgebreid kunnen worden of kan eventueel gebruik gemaakt worden van de Wavemetrics functie *Skeleton2* (zie 6.2.3).

6.7 Besluit

We hebben een algoritme ontwikkeld dat het spoor van een mitochondrion in de tijd/ruimte-kaart semi-automatisch kan detecteren. Het gebruik ervan verkort de analysetijd drastisch terwijl de gemiddelde accuraatheid vergelijkbaar is met die van een gemiddelde ervaren gebruiker. Daarenboven kan het algoritme een meerwaarde betekenen voor het aanduiden van sterk oscillerende mitochondriën omdat het algoritme de oscillaties in meer detail kan

volgen dan de gemiddelde gebruiker. De gebruiker heeft voor de aanduiding van de sporen keuze uit de oorspronkelijke aanduidmogelijkheden en deze nieuwe semi-automatische *tool* waardoor het bovenop de tijdswinst meer flexibiliteit biedt. Manuele en automatische lokale correctie is steeds mogelijk, evenals globale correctie via adaptatieparameters. Het beste resultaat op gebied van snelheid en nauwkeurigheid zal bekomen worden met een combinatie van manuele en automatische aanduiding en vooral een kritisch en getraind oog van de gebruiker.

7. Algemeen besluit

7.1 Inleiding

In dit hoofdstuk wordt een overzicht geboden van alle besluiten per vooropgestelde doelstelling. Tot slot worden enkele suggesties gedaan voor toekomstig werk.

7.2 Conclusie

1) Hoofdstuk 4 behandelt de *MitoTracker Green* experimenten waar een kwalitatieve en kwantitatieve beschrijving van het mitochondriaal transport in muisculturen met enterische neuronen gemaakt wordt. Uit de kwalitatieve beschrijving van een aantal specifieke transportfenomenen van mitochondriën ontstonden aanwijzingen van factoren die het transport kunnen beïnvloeden. Zo is invloed van mechanische factoren (vorm van het spoor, uitlopervorm, druk van naburige cellen of uitlopers,...) op het transport waarschijnlijk en lijkt fissie en fusie een rol te spelen in het transport. Fissie zou grote mitochondriën helpen transporteren doordat bij het afsplitsen een acceleratie plaats vindt. Daartegenover kan fusie en accumulatie een hinder betekenen voor het transport. Dat zou impliceren dat transport afhankelijk kan zijn van de grootte van een mitochondrion. Mitochondriën lijken invloed te hebben op elkaars snelheid: gericht transport treedt op wanneer mitochondriën fusie ondergaan. Mitochondriën nabij het cellichaam zijn in staat parallel te bewegen nadat ze op hetzelfde spoor contact maakten. Dit doet vermoeden dat mitochondriën de grootte, zin en richting van elkaars snelheid kunnen beïnvloeden en dat parallelle cytoskeletsporen bestaan nabij het cellichaam. Daar zijn ook rotatie en dwarse positionering van mitochondriën geobserveerd. Mogelijk hebben oscillerende mitochondriën een assisterende functie bij het transport van andere mitochondriën.

Uit de cijfergegevens blijkt dat in deze muisculturen met enterische neuronen meer transportactiviteit plaats vindt in cellen van het type B maar dat transport in neuronen efficiënter is aangezien voor neuronen minder oscillerende mitochondriën en meer 'rechtstreeks' transport (mitochondriën zonder richtingsveranderingen en een beduidende span) waargenomen is.

Ook bewegen de neuronale mitochondriën minder ver en minder lang. Uit de meeste parameters blijkt ook een grotere gelijkheid tussen transport in gliacellen en neuronen. Verder werden in neuronen veel stationaire mitochondriën vastgesteld met een gelijkmatige verdeling over de uitloper.

Enkele transfectiemethoden werden uitgetoetst om de analyse te vereenvoudigen. Transfecties kunnen een oplossing bieden voor het identificeren van celtypen omdat celspecifieke promotoren in de vector kunnen geïncorporeerd worden en zo celspecifieke kleuring bieden. Het onderscheiden van uitlopers en het identificeren van de bijbehorende cellichamen wordt eenvoudiger wanneer naburige cellichamen en uitlopers niet gekleurd zijn of wanneer een bepaald celtype met een specifieke kleuring in beperkte dichtheid voorkomt in de celcultuur. De lage transfectie-efficiëntie in primaire culturen van neuronen heeft echter wel het nadeel dat meer experimenten nodig zijn om eenzelfde hoeveelheid data te bekomen.

2) Onder de gegeven condities van deze experimenten werd geen correlatie tussen de puntsnelheden en de mitochondriale membraanpotentialen gevonden.

3) Hoofdstuk 6 behandelt de ontwikkeling van een nieuw algoritme dat het spoor van een mitochondrion in de tijd/ruimte-kaart semi-automatisch kan detecteren. Het gebruik ervan verkort de analysetijd drastisch terwijl de gemiddelde accuraatheid vergelijkbaar is met die van een gemiddelde ervaren gebruiker. Daarenboven kan het algoritme een meerwaarde betekenen voor het aanduiden van sterk oscillerende mitochondriën omdat het algoritme de oscillaties in meer detail kan volgen dan de gemiddelde gebruiker. De gebruiker heeft voor de markering van de sporen keuze uit de oorspronkelijke aanduidmogelijkheden en deze nieuwe semi-automatische *tool* waardoor het bovenop de tijdsbesparing meer flexibiliteit biedt. Manuele en automatische lokale correctie is steeds mogelijk, evenals globale correctie via adaptatieparameters. Het beste resultaat op gebied van snelheid en nauwkeurigheid zal bekomen worden met een combinatie van manuele en automatische aanduiding en vooral een kritisch en getraind oog van de gebruiker.

7.3 Toekomstig werk

1) Gelijkaardige beschrijvingen van het mitochondriaal transport in deze muiselculturen met enterische neuronen kunnen gebeuren na toevoeging van mitochondriale farmaca die het transport zullen beïnvloeden zoals FCCP. De bekomen set gegevens is dan een referentie om het effect op het transport te kwantificeren en te vergelijken. Transfectiemethoden kunnen op punt gesteld worden zodat aan de moeilijkheden van de analyse tegemoet gekomen wordt.

2) Verder onderzoek moet aantonen of het gegeven dat geen correlatie tussen de mitochondriale membraanpotentialaalen de puntsnelheden specifiek is voor enterische neuronen. Om de relatie nog beter te onderzoeken zullen de celculturen verder geoptimaliseerd worden zodat er meer mitochondriaal transport in de neuronale uitlopers voorkomt. Ondanks dat in de gegeven dataset geen correlatie gevonden werd, is het bestaan van een correlatie tussen mitochondriaal transport en de mitochondriale membraanpotentialaalen niet uitgesloten. Toekomstig onderzoek zou zich kunnen richten naar het verband tussen veranderingen in mitochondriale membraanpotentialaalen en transport van naburige mitochondriën.

3) Om het algoritme te verbeteren zijn er tal van mogelijkheden. Eén van de voornaamste zou een analyse van het breedteprofiel van een mitochondriaal spoor kunnen zijn. Daardoor zou ook informatie kunnen bijgehouden worden over de grootte van het mitochondrion. Fissie en fusie of kruisingen zouden gedetecteerd kunnen worden. Het gemiddelde van dit intensiteitsbreedteprofiel ($\sum [x_j \cdot I_j(x_j)]$) van het spoor zou kunnen gebruikt worden als punt voor het pad in plaats van het maximum, dat in het huidige algoritme gebruikt wordt, zodat het hele mitochondrion in rekening gebracht wordt voor zijn positiebepaling. Het overspringen naar een ander spoor zou zo vermeden kunnen worden. Wanneer informatie zoals hoeken, intensiteit en grootte van vorige punten van het pad worden bijgehouden, kunnen deze data actief gebruikt worden om tijdens de uitvoering van het algoritme te controleren welke stap de meest plausibele zou zijn. Verder zou het nog meer

tijdswinst opleveren om te automatiseren op niveau van de volledige kaart en het algoritme zelf het aantal en de plaatsen van de mitochondriën te laten detecteren omdat dan met één klik een reeks verschillende mitochondriën gedetecteerd zouden worden. Het zou ook de implementatie vergemakkelijken van functies voor onderzoek naar verbanden tussen naburige mitochondriën. Wanneer 4D-data beschikbaar zijn, zou dit algoritme naar vier dimensies uitgebreid kunnen worden of kan eventueel gebruik gemaakt worden van de Wavemetrics functie *Skeleton2* (zie 6.2.3).

Bijlage A

Datum	Film ID	Naam	Frames	Celtype	Uitloper nr.	# Mito	Bestandsreferentie
4/11/2010	7F	CS2_mito2	200	A	1	16	04112010_7F_1
4/11/2010	7F	CS2_mito2	200	A	2	12	04112010_7F_2
4/11/2010	74	CS1_mito1	200	B	1	6	04112010_74_1
10/11/2010	16	CS1_glia	200	A	1	12	10112010_16_1
10/11/2010	16	CS1_glia	200	A	2	10	10112010_16_2
10/11/2010	16	CS1_glia	200	A	3	2	10112010_16_3
10/11/2010	22	CS2_glia	200	A	1	17	10112010_22_1
10/11/2010	22	CS2_glia	200	A	2	22	10112010_22_2
10/11/2010	22	CS2_glia	200	B	3	15	10112010_22_3
10/11/2010	22	CS2_glia	200	A	4	6	10112010_22_4
17/11/2010	13E	MC2_75_1	200	B	1	10	17112010_13E_1
22/11/2010	52	CS2c	200	B	1	16	22112010_52_1
22/11/2010	52	CS2c	200	B	2	5	22112010_52_2
22/11/2010	52	CS2c	200	B	3	8	22112010_52_3
22/11/2010	52	CS2c	200	B	4	2	22112010_52_4
22/11/2010	52	CS2c	200	B	5	18	22112010_52_5
22/11/2010	26	CS1c	200	B	1	9	22112010_26_1
22/11/2010	A1	CS4c	200	B	1	13	22112010_A1_1
2/12/2010	15D	CS2a	200	A	1	14	02122010_15D_1
9/12/2010	12D	CS1_3	200	C	1	21	09122010_12D_1
9/12/2010	12D	CS1_3	200	C	2	4	09122010_12D_2
9/12/2010	12D	CS1_3	200	C	3	5	09122010_12D_3
17/12/2010	9B	CS1a	200	B	1	5	17122010_9B_1
17/12/2010	127	CS4a	200	B	1	5	17122010_127_1
17/12/2010	127	CS4a	200	B	2	3	17122010_127_2
17/12/2010	F5	CS2d	200	C	1	6	17122010_F5_1
17/12/2010	B1	CS1b	200	A	1	5	17122010_B1_1
17/12/2010	B1	CS1b	200	B	2	7	17122010_B1_2
11/03/2011	A3	CS1Green	200	C	1	16	11032011_A3_1
11/03/2011	A3	CS1Green	200	C	2	11	11032011_A3_2
11/03/2011	A3	CS1Green	200	C	3	22	11032011_A3_3
11/03/2011	A3	CS1Green	200	C	4	21	11032011_A3_4
11/03/2011	B4	CS2_Green	200	C	1	26	11032011_B4_1
18/03/2011	4F	CS1_green(a)	200	C	1	18	18032011_4F_1
24/03/2011	135	CS2B_mitrogreen	200	C	1	11	24032011_135_1
		...					

A.1 Overzichtstabel van geanalyseerde uitlopers.

```

Function collectData(row.name)

variable row
string name

variable points=countObjects("root:data",1)
variable i

Make/O/N=(points) test

for(i=0;i<points;i+=1)
  string temp=getIndexedObjname("root:data",1,i)
  wave w=root:data:$temp
  test[i]=w[row]
endfor

rename test,$name

end

```

- collectData(17,"netdisplacement")
- collectData(18,"span")
- collectData(22,"avgspeed")
- collectData(23,"topspeedantero")
- collectData(24,"topspeedretro")
- collectData(25,"avganterospeed")
- collectData(26,"avgretrospeed")
- collectData(39,"totaltimetraveled")
- collectData(44,"directionchanges")
- collectData(13,"startposition")
- collectData(9,"fiberlength")

A.2 Zelf ontwikkelde functie *collectData* en *command-line* opdrachten voor het verzamelen van de parameterdata van alle mitochondriën.

```

Function makeHistDataRelative(total)

variable total

wave avganterospeed_Hist,avgretrospeed_Hist,avgspeed_Hist,directionchanges_Hist,netdisplacement_Hist
wave span_Hist, topspeedantero_Hist, topspeedretro_Hist,totaltimetraveled_Hist

duplicate avganterospeed_Hist,avganterospeed_Hist_relative
duplicate avgretrospeed_Hist,avgretrospeed_Hist_relative
duplicate avgspeed_Hist,avgspeed_Hist_relative
duplicate directionchanges_Hist,directionchanges_Hist_relative
duplicate netdisplacement_Hist,netdisplacement_Hist_relative
duplicate span_Hist,span_Hist_relative
duplicate topspeedantero_Hist,topspeedantero_Hist_relative
duplicate topspeedretro_Hist,topspeedretro_Hist_relative
duplicate totalimetraveled_Hist,totaltimetraveled_Hist_relative

avganterospeed_Hist_relative=avganterospeed_Hist*(100/total)
avgretrospeed_Hist_relative=avgretrospeed_Hist*(100/total)
avgspeed_Hist_relative=avgspeed_Hist*(100/total)
directionchanges_Hist_relative=directionchanges_Hist*(100/total)
netdisplacement_Hist_relative=netdisplacement_Hist*(100/total)
span_Hist_relative=span_Hist*(100/total)
topspeedantero_Hist_relative=topspeedantero_Hist*(100/total)
topspeedretro_Hist_relative=topspeedretro_Hist*(100/total)
totalimetraveled_Hist_relative=totaltimetraveled_Hist*(100/total)

End

```

A.3 Zelf ontwikkelde functie voor omzetting naar relatieve frequentie van de data in de histogrammen.

```

Window Graph15() : Graph
PauseUpdate; Silent 1 // building window...
Display /W=(354.75,121.25,681,416.75) topspeedantero_Hist_relative
ModifyGraph mode=5
ModifyGraph nticks(left)=20
ModifyGraph minor(left)=1
Label left "%"
Label bottom "µm/s"
SetAxis left 0,80
SetAxis/A/N=1 bottom
TextBox/C/N=text0/A=MC/X=14.12/Y=37.28 "topsnelheid antero"
EndMacro

```

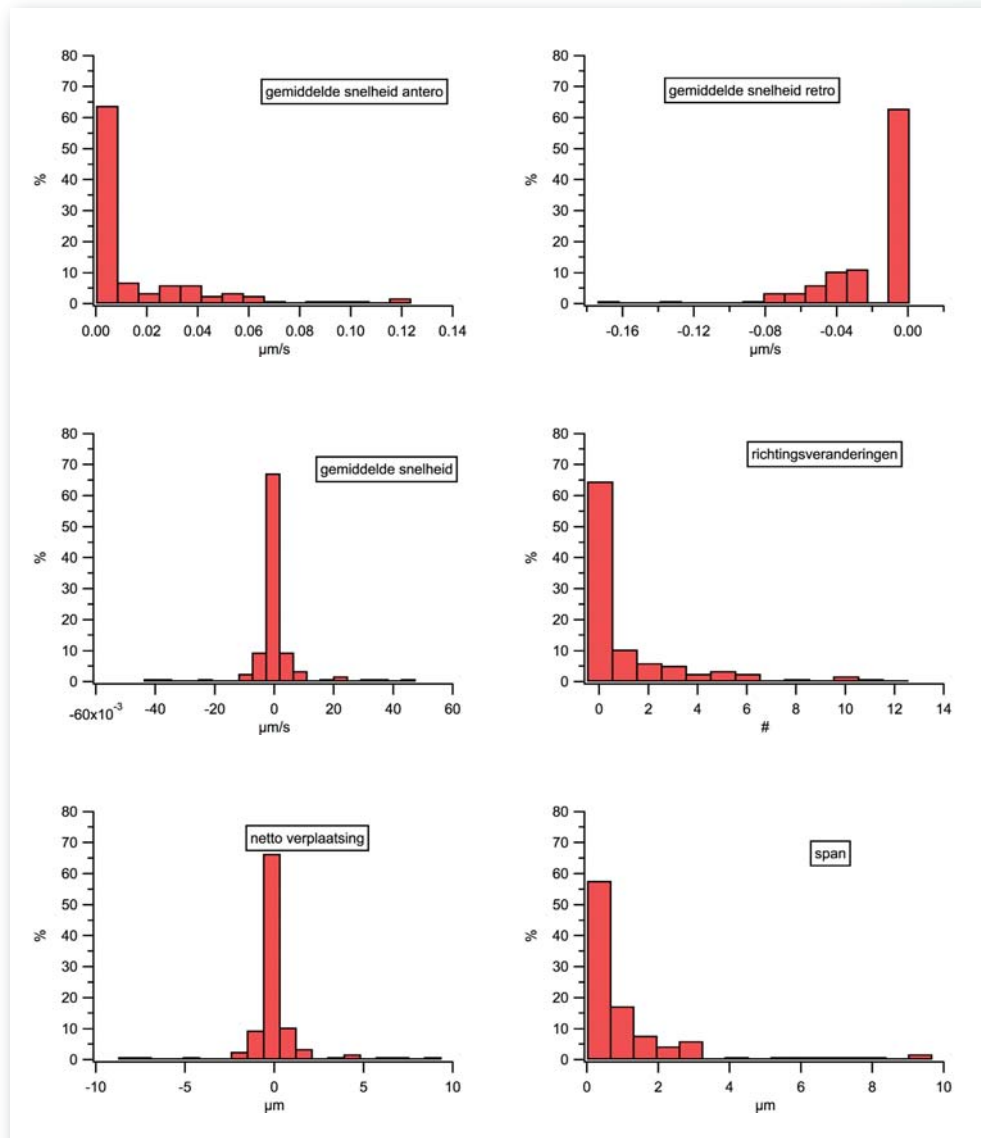
A.4 Voorbeeld van een histogrammacro. Kopiëren en wijzigen van enkele waarden maakt snelle reproductie van de verschillende histogrammen mogelijk.

- duplicate span,mask
- mask=!mask
- collectdata(13,"startposition")
- startposition*!=mask
- display startposition vs fiberlength

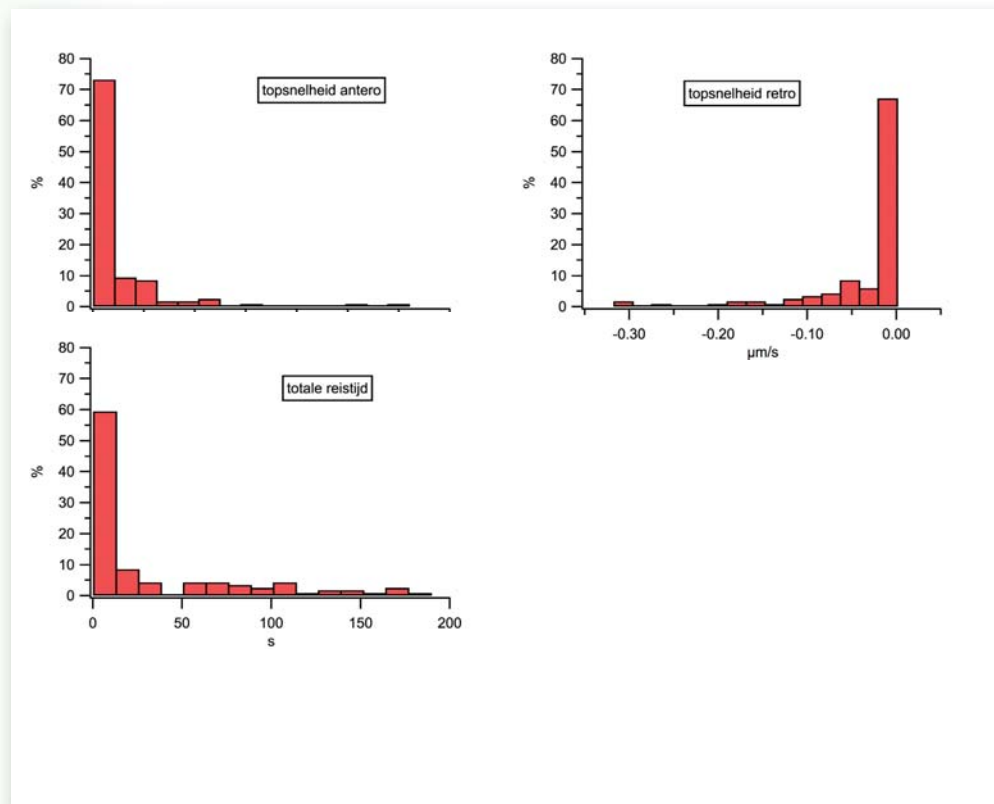
A.5 Methode om de stationaire mitochondriën uit te zetten tegenover de uitooperlengte via command-line opdrachten: elke span wordt gekopieerd, daarna wordt elke span die verschilt van nul, nul en elke span die nul is wordt een. Alle startposities worden verzameld en vermenigvuldigd met de respectievelijke binaire waarde. Zo worden enkel de posities van stationaire mitochondriën behouden. Voor deze mitochondriën is de startpositie gelijk aan de positie op elk tijdstip.

A.6 Histogrammen van 9 transportparameters voor elk onderscheiden celtype. De gemiddelde retrograde snelheid is het gemiddelde van alle puntsnelheden in retrograde zin van een mitochondrion. De gemiddelde anterograde snelheid is het gemiddelde van alle puntsnelheden in anterograde zin van een mitochondrion.

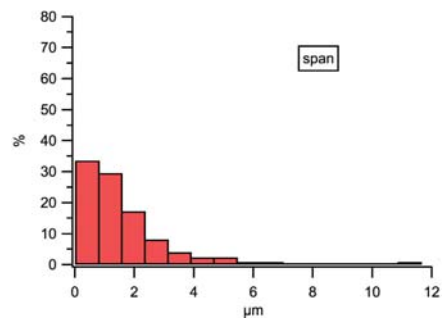
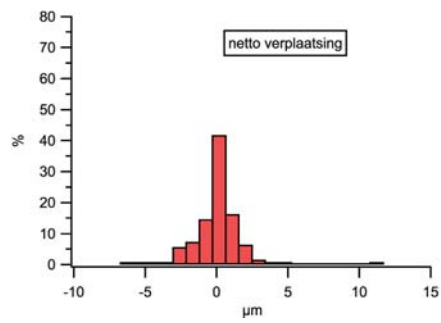
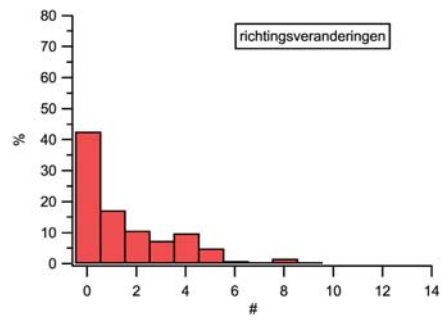
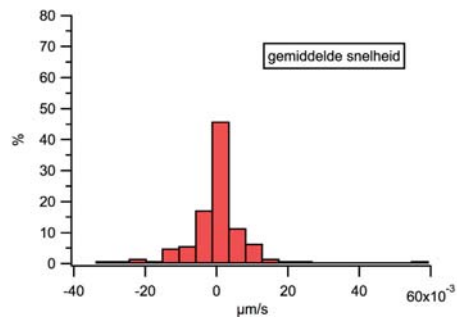
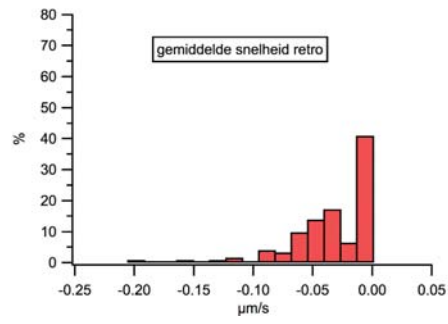
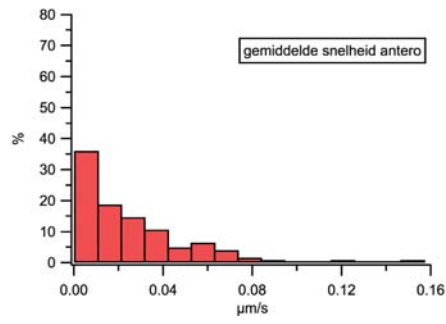
Type A (glia)



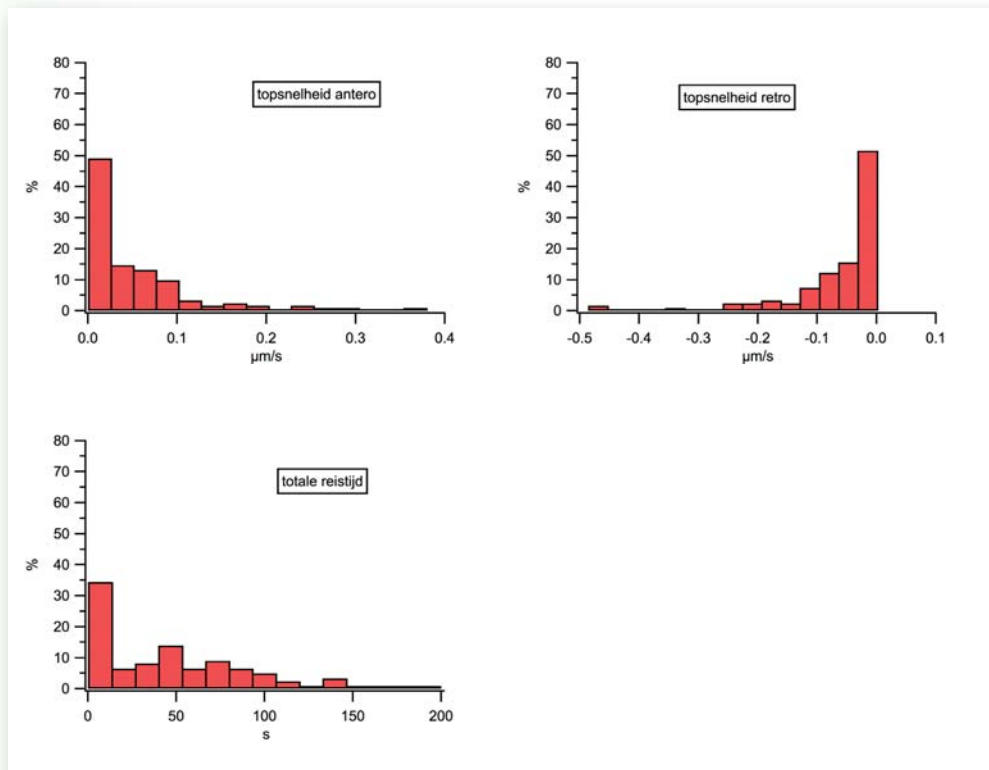
Type A (glia)



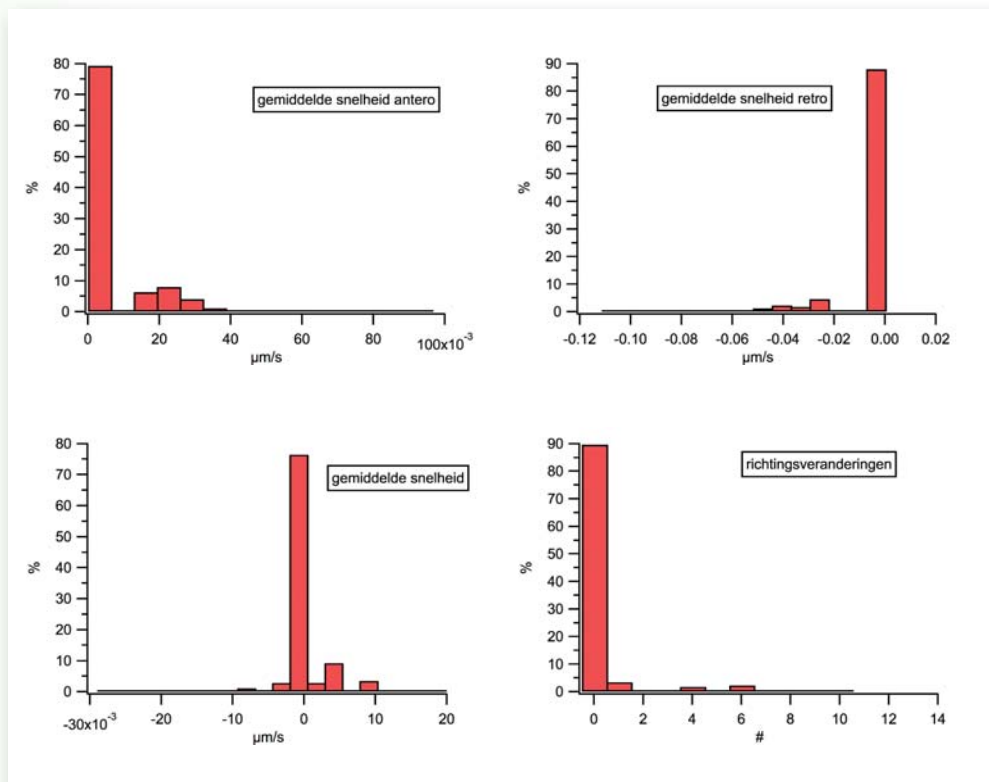
Type B



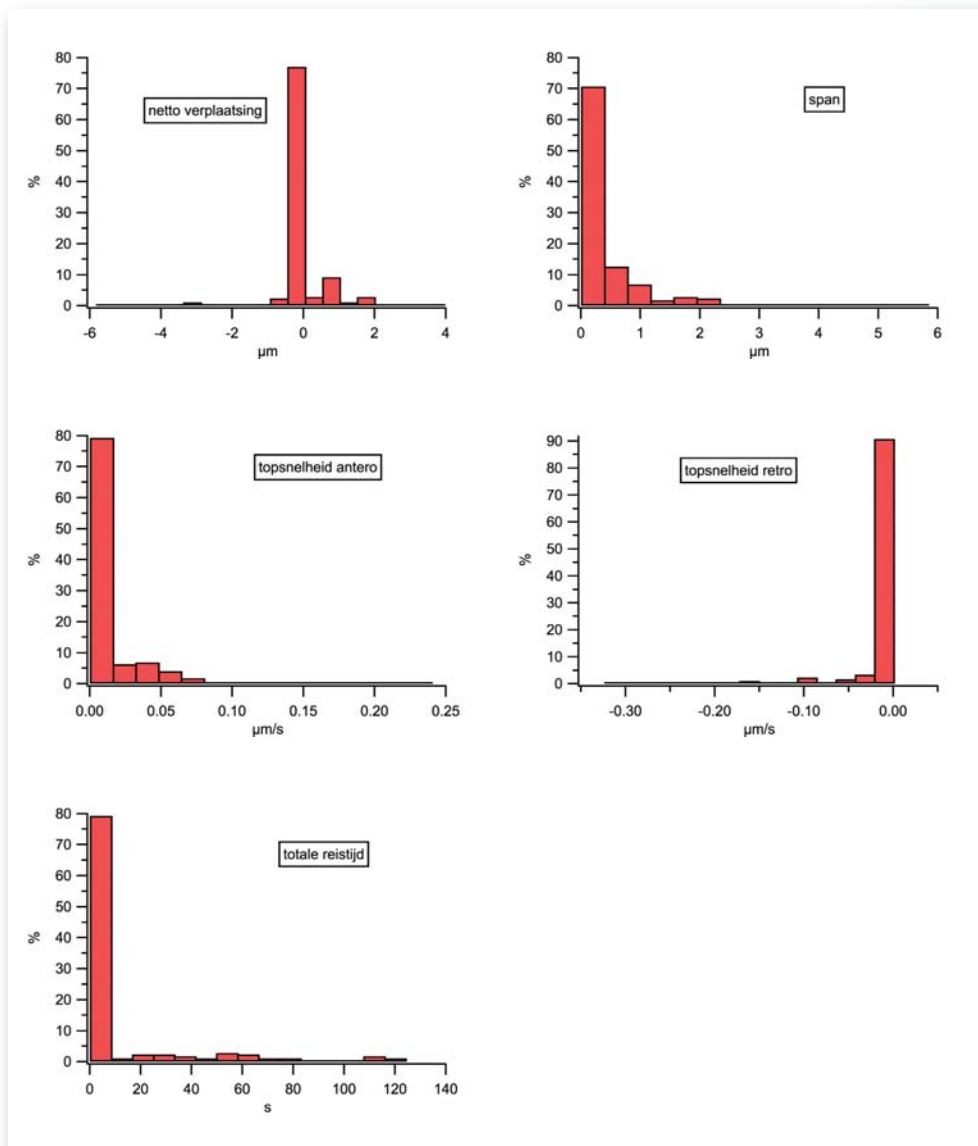
Type B



Type C (neuron)



Type C (neuron)



• `imagertransform/p=0/insi='X_18_MAX_0>200'` insertimage X_18

A.7 *command-line* opdracht voor het toevoegen van een maximumprojectie aan een video-opname.

	striataal	enterisch
TFneurons/neurons:	0,093	0,222
TFcells/totalcells:	0,049	0,054
Ratio:	1,881	4,138
TFneurons/totalcells	0,036	0,005
TFneurons/TFcells	0,733	0,087

A.8 Transfectie-efficiëntie in striatale en enterische neuronen.

Bijlage B

```
Function CorrelateIntensity(intensity,position,timewave)

wave intensity,position,timewave

if(dimension(intensity,0)!=dimension(position,0))
print "waves have different length"
return 0
endif

differentiate position/X=timewave/D=dif
differentiate dif/X=timewave/D=dif2

nvar V_lincorcoef=root:correlation_data:V_lincorcoef
nvar V_lincorcoef_dif=root:correlation_data:V_lincorcoef_dif
nvar V_lincorcoef_dif2=root:correlation_data:V_lincorcoef_dif2

V_lincorcoef=statscorrelation(intensity,position) // correlation coefficients
V_lincorcoef_dif=statscorrelation(intensity,dif)
V_lincorcoef_dif2=statscorrelation(intensity,dif2)

Duplicate/O position,W_corr;DelayUpdate // correlation functions
Correlate Intensity,W_corr
Duplicate/O dif,W_dif_corr;DelayUpdate
Correlate Intensity,W_dif_corr
Duplicate/O dif2,W_dif2_corr;DelayUpdate
Correlate Intensity,W_dif2_corr

End
```

B.1 De functie *CorrelateIntensity* geeft correlatieinformatie op basis van de intensiteit- en positie-informatie van één mitochondrion.

```
Function CorrelateGroup()

string sdf=getdatafolder(1)
setdatafolder root:particle_traces
String pos=WaveList("*_D",";","")
String int=WaveList("*_I",";","")

Dowindow/K position
Dowindow/K graph1
Dowindow/K graph2
Dowindow/K graph3
Dowindow/K graph4
Dowindow/K graph5

killdatafolder/Z root:correlation_data
newdatafolder/O root:correlation_data
setdatafolder root:correlation_data

String theWave
Variable index=0
```

```
Make/O/n=(0) corcoef,corcoef_dif,corcoef_dif2
Make/O/n=(0)/T referencelist
```

```
cb
```

```
// Get the next wave name
theWave = StringFromList(index, pos)
if (strlen(theWave) == 0)
    break // Ran out of waves
endif
if (stringmatch(int,"*" + theWave[0,strlen(theWave)-3] + "_I*"))
    redimension/n=(dimsiz(e,corcoef,0)+1) corcoef,corcoef_dif,corcoef_dif2,referencelist
    string base=theWave[0,strlen(theWave)-3]

    wave I=root:particle_traces:$(base+"_I")
    wave D=root:particle_traces:$(base+"_D")
    wave T=root:particle_traces:$(base+"_T")

    variable/G V_lincorcoef
    variable/G V_lincorcoef_dif
    variable/G V_lincorcoef_dif2

    CorrelateIntensity(I,D,T)
    corcoef[index]=V_lincorcoef
    corcoef_dif[index]=V_lincorcoef_dif
    corcoef_dif2[index]=V_lincorcoef_dif2
    referencelist[index]=base

    Rename V_lincorcoef,$cleanupname((base+"_corcoef"),0)
    Rename V_lincorcoef_dif,$cleanupname((base+"_dif_corcoef"),0)
    Rename V_lincorcoef_dif2,$cleanupname((base+"_dif2_corcoef"),0)
    Rename W_corr,$(base+"_corfunc")
    Rename W_dif_corr,$(base+"_dif_corfunc")
    Rename W_dif2_corr,$(base+"_dif2_corfunc")

    if(index==0)

        display/N=position/W=(7.5,40.25,483.75,256.25) I vs D as "intensity vs position"
        ModifyGraph/W=position mode=3,marker=19,msize=1

        display/N=graph1/W=(499.5,38.75,950.25,256.25) I vs dif as "intensity vs dif"
        ModifyGraph/W=graph1 mode=3,marker=19,msize=1
        display/N=graph2/W=(500.25,275,949.5,503.75) I vs dif2 as "intensity vs dif2"
        ModifyGraph/W=graph2 mode=3,marker=19,msize=1

    else
        Duplicate dif,$("v"+num2str(index))
        Duplicate dif2,$("a"+num2str(index))

        appendtograph/C=(abs(enoise(65535)),abs(enoise(65535)),abs(enoise(65535)))/W=position
        ModifyGraph/W=position mode=3,marker=19,msize=1
        appendtograph/C=(abs(enoise(65535)),abs(enoise(65535)),abs(enoise(65535)))/W=graph1
        ModifyGraph/W=graph1 mode=3,marker=19,msize=1
        appendtograph/C=(abs(enoise(65535)),abs(enoise(65535)),abs(enoise(65535)))/W=graph2
        ModifyGraph/W=graph2 mode=3,marker=19,msize=1
    endif

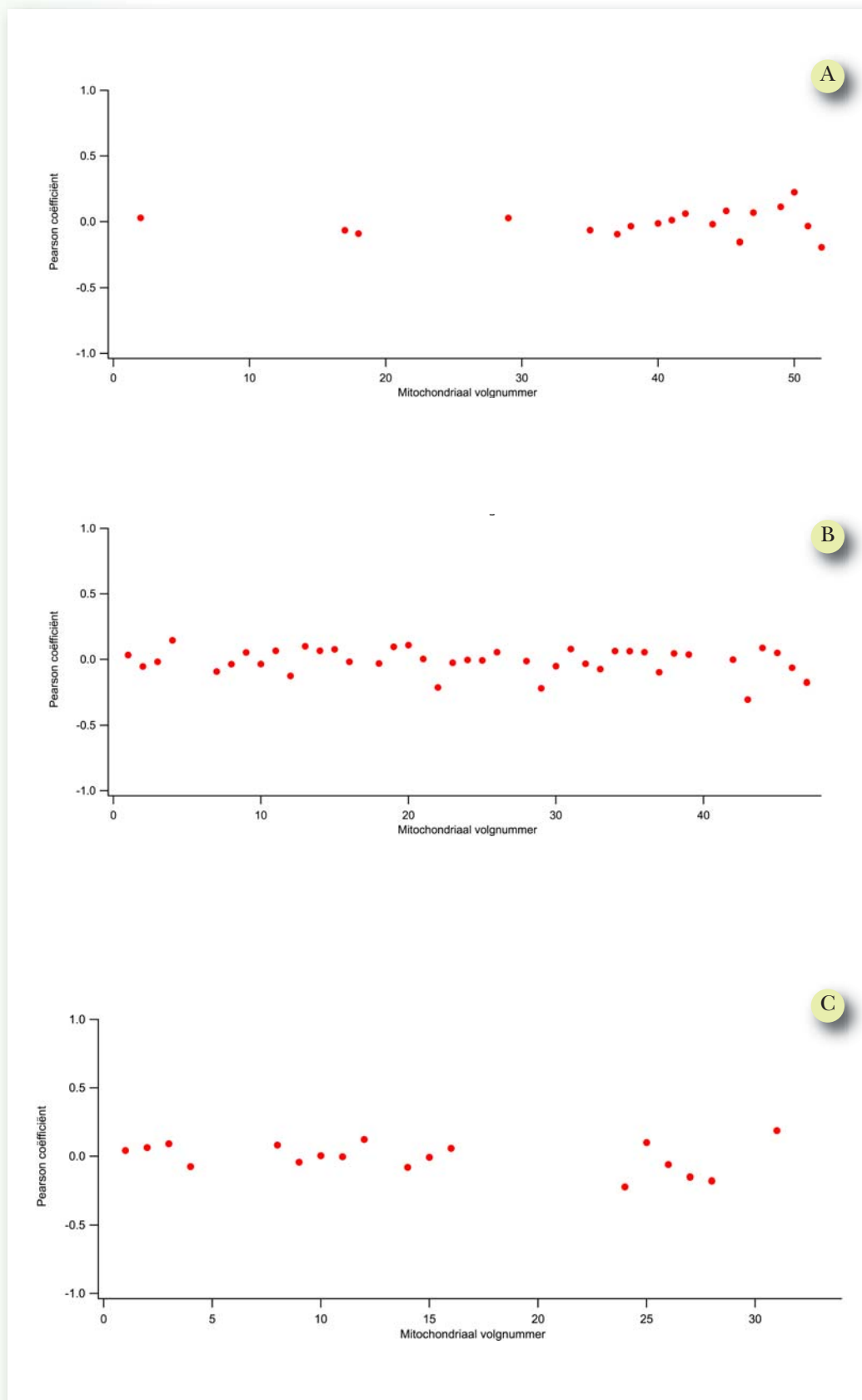
    endif
    index += 1
while (1) // Loop until break above

display/N=graph3/W=(9,278.75,486,499.25) corcoef as "correlation coefficients"
ModifyGraph/W=graph3 mode=3,marker=19
display/N=graph4/W=(27,521.75,496.5,703.25) corcoef_dif as "correlation coefficients derivative/int
ModifyGraph/W=graph4 mode=3,marker=19
display/N=graph5/W=(501.75,522.5,951,703.25) corcoef_dif2 as "correlation coefficients 2e derivat
ModifyGraph/W=graph5 mode=3,marker=19

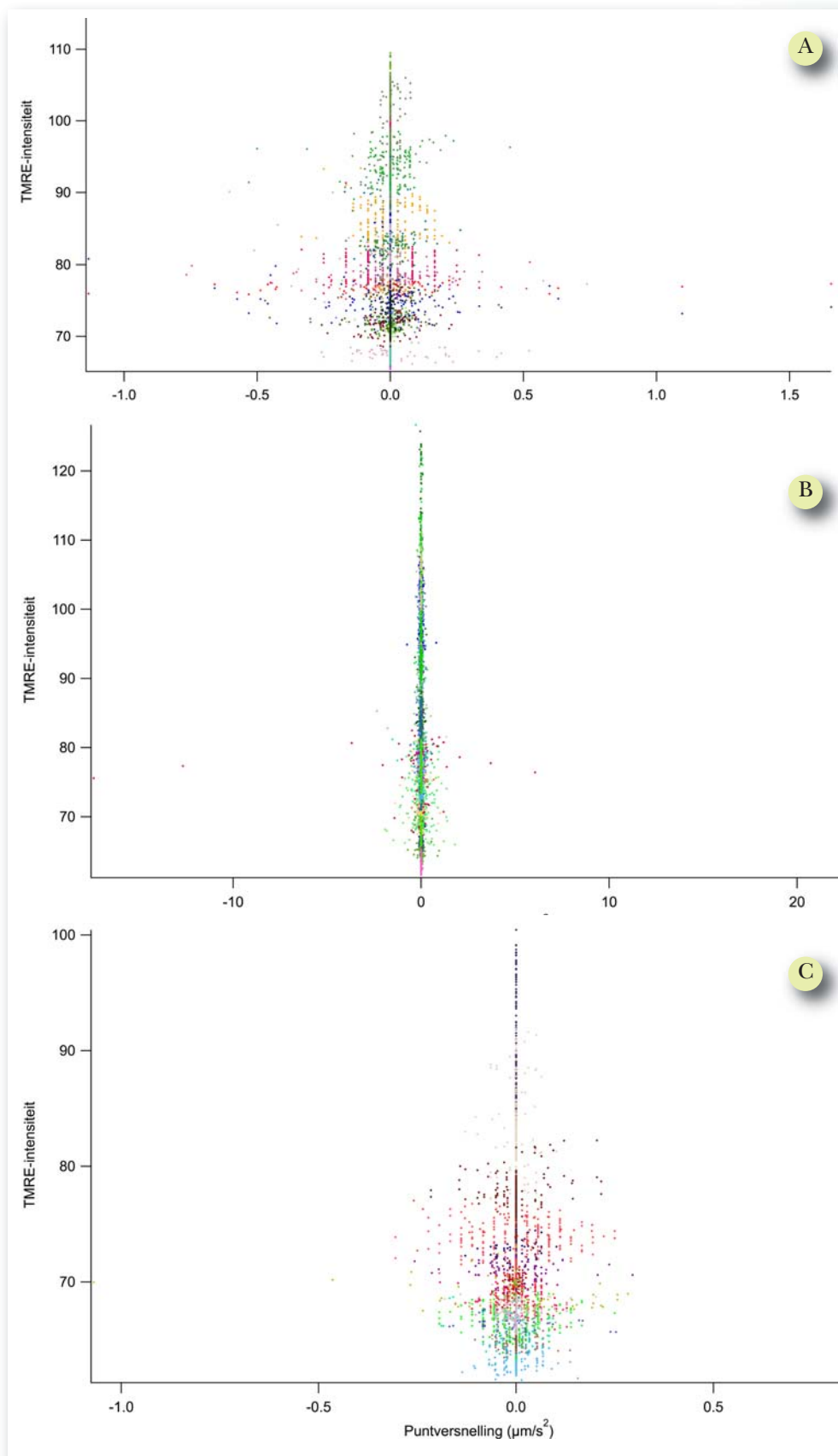
    setdatafolder sdf

    End
```

B.2 De functie *CorrelateGroup* verzamelt correlatiegegevens van verschillende mitochondriën.



B.3 Correlatiecoëfficiënten van een correlatie tussen TMRE-intensiteit en versnelling tonen ook geen lineair verband aan in de drie celtypes, respectievelijk type A, type B en type C.



B.4 Spreidingsdiagrammen van de TMRE-intensiteit versus puntversnellingen van alle mitochondriën (elk verschillend gekleurd) in A. Celtype A (glia) B. Celtype B en C. Celtype C (neuron).

Bijlage C

```
Function GaussFilter (wave_in,var1)
Variable var1
Wave wave_in

//convolution
FFT/Dest=freqwave wave_in
freqwave*=cplx(exp(-(x^2+y^2)/var1),0)
IFFT freqwave
End
```

C.1 Zelf geschreven Gaussfilter die werkt in het frequentiedomein door gebruik van de Fourier transformatie (FFT).

```
•ImageSeedFill/B=0 min=80, max=255, seedx=702, seedY=265, seedR=6, target=1, srcWave=image0
```

C.2 *Command-line* opdracht voor een *imageSeedFill* operatie.

C.3 Igor code van het algoritme en alle voorgaande functies.

```
#pragma rtGlobals=1      // Use modern global access method.

Function Path3(w)
  wave w

  variable X=xcsr(A)
  variable Y=vcsr(A)
  variable i,nr
  string strace="trace0"

  Make/N=(1,2) trace

  trace[0][0]=X
  trace[0][1]=Y

  // w[X-1][Y+1]
  // w[X][Y+1]
  // w[X+1][Y+1]
```

```

for(i=1;i<dimsize(w,0);i+=1)
Redimension/N=(i+1,2) trace
X=trace[i-1][0]
Y=trace[i-1][1]
if(w[X-1][Y+1]>w[X][Y+1]&&w[X-1][Y+1]>w[X+1][Y+1])
trace[i][0]=X-1
trace[i][1]=Y+1
elseif(w[X][Y+1]>w[X-1][Y+1]&&w[X][Y+1]>w[X+1][Y+1])
trace[i][0]=X
trace[i][1]=Y+1
elseif(w[X+1][Y+1]>w[X-1][Y+1]&&w[X+1][Y+1]>w[X][Y+1])
trace[i][0]=X+1
trace[i][1]=Y+1
elseif(w[X+1][Y+1]==w[X][Y+1]&&w[X][Y+1]==w[X+1][Y+1])
trace[i][0]=X
trace[i][1]=Y+1
elseif(w[X][Y+1]==w[X+1][Y+1]&&w[X][Y+1]>w[X-1][Y+1])
trace[i][0]=X+1
trace[i][1]=Y+1
elseif(w[X][Y+1]==w[X-1][Y+1]&&w[X-1][Y+1]>w[X+1][Y+1])
trace[i][0]=X-1
trace[i][1]=Y+1
endif
Endfor

```

```

AppendToGraph trace[][1] vs trace[][0]
SetAxis bottom 0,343
SetAxis/R left 200,0

```

```

for(nr=0;waveExists($strace);nr+=1)
strace="trace"+num2istr(nr)
endfor

rename trace,$strace

```

End

Function Path5(w)

```

wave w

```

```

variable X=xcsr(A)
variable Y=vcsr(A)
variable i,nr
string strace="trace0"

```

```

Make/O/N=(1,2) trace

```

```

trace[0][0]=X
trace[0][1]=Y

```

```

variable a=w[X-2][Y+1]
variable b=w[X-1][Y+1]
variable c=w[X][Y+1]
variable d=w[X+1][Y+1]
variable e=w[X+2][Y+1]

```

```

for(i=1;i<dimsize(w,0);i+=1)
Redimension/N=(i+1,2) trace
X=trace[i-1][0]
Y=trace[i-1][1]
a=w[X-2][Y+1]

```

```

b=w[X-1][Y+1]
c=w[X][Y+1]
d=w[X+1][Y+1]
e=w[X+2][Y+1]

if(c>=a&& c>=b&& c>=d&& c>=e)
trace[i][0]=X
trace[i][1]=Y+1
elseif(a>=b&& a>=c&& a>=d&& a>=e)
trace[i][0]=X-2
trace[i][1]=Y+1
elseif(b>=a&& b>=c&& b>=d&& b>=e)
trace[i][0]=X-1
trace[i][1]=Y+1
elseif(d>=a&& d>=b&& d>=c&& d>=e)
trace[i][0]=X+1
trace[i][1]=Y+1
elseif(e>=a&& e>=b&& e>=c&& e>=d)
trace[i][0]=X+2
trace[i][1]=Y+1

endif
Endfor

AppendToGraph trace1[][1] vs trace1[][0]
SetAxis bottom 0,343
SetAxis/R left 200,0

for(nr=0;waveExists($strace);nr+=1)
strace="trace"+num2istr(nr)
endfor
rename trace,$strace

```

End

```

Function PathN(w,n)
wave w
variable n

variable X=xcsr(A)
variable Y=vcsr(A)

variable i,j,traceIndex
variable half_width=floor(n/2)
string strace="trace0"

Make/O/N=(1,3) trace

trace[0][0]=X
trace[0][1]=Y
trace[0][2]=w[X][Y]

Make/O/N=(n) intensity

for(i=1;i<dimsizes(w,0);i+=1)
Redimension/N=(i+1,3) trace
X=trace[i-1][0]
Y=trace[i-1][1]

```

```

for(i=1;i<dimsize(w,0);i+=1)
Redimension/N=(i+1,3) trace
X=trace[i-1][0]
Y=trace[i-1][1]

for(j=-half_width;j<=half_width;j+=1)
intensity[j+half_width]=w[X+j][Y+1]
endfor

waveStats/Q intensity
trace[i][0]=X+V_maxloc-half_width
trace[i][1]=Y+1
trace[i][2]=V_max

Endfor

AppendToGraph trace[][1] vs trace[][0]
SetAxis bottom 0,343
SetAxis/R left 200,0

for(tracelIndex=0;waveExists($strace);tracelIndex+=1)
strace="trace"+num2istr(tracelIndex)
endfor
rename trace,$strace

killwaves intensity
End

```

```

Function LimitedPathN(w,n,length)
wave w
variable n, length

variable X=xcsr(A)
variable Y=vcsr(A)

variable i,j,tracelIndex
variable half_width=floor(n/2)
string strace="trace0"

Make/O/N=(1,3) trace

trace[0][0]=X
trace[0][1]=Y
trace[0][2]=w[X][Y]

Make/O/N=(n) intensity

for(i=1;i<length;i+=1)
Redimension/N=(i+1,3) trace
X=trace[i-1][0]
Y=trace[i-1][1]

for(j=-half_width;j<=half_width;j+=1)
intensity[j+half_width]=w[X+j][Y+1]
endfor

waveStats/Q intensity
trace[i][0]=X+V_maxloc-half_width

```

```

trace[i][1]=Y+1
trace[i][2]=V_max

Endfor

AppendToGraph trace[][1] vs trace[][0]
SetAxis bottom 0,343
SetAxis/R left 200,0

for(tracelIndex=0;waveExists($strace);tracelIndex+=1)

strace="trace"+num2istr(tracelIndex)
endfor
rename trace,$strace

killwaves intensity
End

-----
//function creating a trace between csrA and csrB

Function InterPath(w,downsamplefactor,upsamplefactor,decbysmth,boxcarwidth,iterations,[n])
wave w
variable n,downsamplefactor,upsamplefactor,decbysmth,boxcarwidth,iterations

variable lower_X,upper_X,lower_Y,upper_Y
SVAR graph=root:Packages:PVB2ImProcess:LineProfile:imageGraphName

if(strlen(graph)<=0) //in case the name is ""; graphname is linked to selectnew
PVB2ImageLineProfileUpdateProc() // and remove functions
endif

String dfSav= GetDataFolder(1)
setDataFolder root:

variable AX=xcsr(A,graph) //getting the csr coordinates
variable AY=vcsr(A,graph)
variable BX=xcsr(B,graph)
variable BY=vcsr(B,graph)

lower_X=BX //defining the lower and upper csr in the map
lower_Y=BY
upper_X=AX
upper_Y=AY

if(AY>BY)
lower_X=AX
lower_Y=AY
upper_X=BX
upper_Y=BY
endif

variable Delta_Y=(lower_Y-upper_Y)

if(ParamsDefault(n))
n=ceil(abs(lower_X-upper_X)/Delta_Y)+5 //defining preparameter n
if(mod(n,2)==0)
n+=1
endif
endif
endif

```



```

strace="trace"+num2istr(traceIndex)
endfor
rename trace,$strace

killwaves intensity
End

-----
//function creating a trace between csrA and csrB

Function InterPath(w,downsamplefactor,upsamplefactor,decbysmth,boxcarwidth,iterations,[n])
    wave w
    variable n,downsamplefactor,upsamplefactor,decbysmth,boxcarwidth,iterations

    variable lower_X,upper_X,lower_Y,upper_Y
    $VAR graph=root:Packages:PVB2ImProcess:LineProfile:imageGraphName

    if(strlen(graph)<=0) //in case the name is ""; graphname is linked to selectnew
        PVB2ImageLineProfileUpdateProc() // and remove functions
    endif

    String dfSav= GetDataFolder(1)
    setDataFolder root:

    variable AX=xcsr(A,graph) //getting the csr coordinates
    variable AY=vcsr(A,graph)
    variable BX=xcsr(B,graph)
    variable BY=vcsr(B,graph)

    lower_X=BX //defining the lower and upper csr in the map
    lower_Y=BY
    upper_X=AX
    upper_Y=AY

    if(AY>BY)
        lower_X=AX
        lower_Y=AY
        upper_X=BX
        upper_Y=BY
    endif

    variable Delta_Y=(lower_Y-upper_Y)

    if(ParamsDefault(n))
        n=ceil(abs(lower_X-upper_X)/Delta_Y)+5 //defining preparameter n
        if(mod(n,2)==0)
            n+=1
        endif
    endif
    ValDisplay valdisp0 value= _NUM:n

    Make/O/N=(1,3) trace //initialising top-down trace

    trace[0][0]=upper_X
    trace[0][1]=upper_Y
    trace[0][2]=w[upper_X][upper_Y]

    Make/O/N=(n) intensity

```

```

variable i,j
variable half_width=floor(n/2)
variable X,Y

for(i=1;i<=Delta_Y;i+=1) //adding points to top-down trace
Redimension/N=(i+1,3) trace
X=trace[i-1][0]
Y=trace[i-1][1]

for(j=-half_width;j<=half_width;j+=1)
intensity[j+half_width]=w[X+j][Y+1]
endfor

waveStats/Q intensity
trace[i][0]=X+V_maxloc-half_width
trace[i][1]=Y+1
trace[i][2]=V_max

endfor

Make/O/N=(1,3) trace_ //initialising bottom-up trace

trace_[0][0]=lower_X
trace_[0][1]=lower_Y
trace_[0][2]=w[lower_X][lower_Y]

for(i=1;i<=Delta_Y;i+=1) //adding points to bottom-up trace
Redimension/N=(i+1,3) trace_
X=trace_[i-1][0]
Y=trace_[i-1][1]

for(j=-half_width;j<=half_width;j+=1)
intensity[j+half_width]=w[X+j][Y-1]
endfor

waveStats/Q intensity
trace_[i][0]=X+V_maxloc-half_width
trace_[i][1]=Y-1
trace_[i][2]=V_max

Endfor

if(n!=1)

j=0
variable start,stop
Make/O/n=(0,3) common //finding common points between
//top-down and bottom-up traces

Reverse/DIM=0 trace_
Make/O/n=(dimsize(trace,0)) dif=trace-trace_

findvalue/V=0 dif
if(V_value!=-1)
cb
if(trace[V_value][1]==trace_[V_value][1])
redimension/n=(dimsize(common,0)+1,3) common
common[j][0]=trace[V_value][0]
common[j][1]=trace[V_value][1]
common[j][2]=trace[V_value][2]
stop=V_value

```

```

endif
endif
findvalue/Z/S=(V_value+1)/V=0 dif
while(V_value!=-1)
else
killwaves intensity,common,dif,trace_
return 2
endif

Redimension/n=(start,3) trace
concatenate/NP=0 {common},trace
deletpoints 0,(stop+1),trace_
if(dimension(trace_,0)!=0)
concatenate/NP=0 {trace_},trace
endif
endif

make/O/N=(dimension(trace,0)) tra=trace[p][1] //interpolating the missing
make/O/N=(dimension(trace,0)) tra2=trace[p][0] //points between the
Redimension/N=(trace[dimension(trace,0)][1]+1,3) trace //common points, in order to
trace[][0] = interp(p,tra,tra2) //have equally spaced points
trace[][1]=p
trace[][2]=w[trace[p][0]][p]
DeletePoints 0,upper_Y,trace

duplicate trace,temptrace
redimension/N=(dimension(temptrace,0)) temptrace
Smooth/B=(iterations)/EVEN/E=3 boxcarwidth,temptrace
trace[0,dimension(temptrace,0)][0]=temptrace[p]
killwaves temptrace

switch(decbysmth) // numeric switch. decimation by user parameters
case 1:
Resample/UP=(upsamplefactor)/DOWN=(downsamplefactor)/WINF=none trace
break
case 2:
Resample/UP=(upsamplefactor)/DOWN=(downsamplefactor)/WINF=hanning trace
break
default:
Resample/UP=(upsamplefactor)/DOWN=(downsamplefactor)/N=3 trace
endswitch

if(trace[dimension(trace,0)-1][1]!=lower_Y) //making sure that start and endpoints
redimension/N=(dimension(trace,0)+1,3) trace // by cursors are guaranteed
trace[dimension(trace,0)-1][0]=lower_X
trace[dimension(trace,0)-1][1]=lower_Y
trace[dimension(trace,0)-1][2]=w[lower_X][lower_Y]
if(n==1)
trace[dimension(trace,0)-1][0]=upper_X
trace[dimension(trace,0)-1][1]=lower_Y
trace[dimension(trace,0)-1][2]=w[upper_X][lower_Y]
endif
endif
if(trace[0][1]!=upper_Y&&(trace[0][1]-upper_Y)>1)
insertpoints 0,1,trace
trace[0][0]=upper_X
trace[0][1]=upper_Y

```

```

trace[0][2]=w[upper_X][upper_Y]
endif
portautotrace(trace)

killwaves intensity,common,dif,trace_
SetDataFolder dfSav
End

```

```

function portAutoTrace(refwave)

```

```

wave refwave

```

```

duplicate/o/R=[0,*][0] refwave, autoX
duplicate/o/R=[0,*][1] refwave, autoY
redimension/n=(dimsize(refwave,0)) autoX, autoY

```

```

PVB2CreateImageLineProfileGraph()

```

```

SVAR imageGraphName= root:Packages:PVB2ImProcess:LineProfile:imageGraphName
String cdf=GetDataFolder(1)
setdatafolder root:WinGlobals:$(imageGraphName):
    duplicate/o root:autoX, FHLineProfileX
    duplicate/o root:autoY, FHLineProfileY
SetDataFolder $cdf

```

```

PVB2SetFHDependency()
PVB2StartEditingPathProfile("")

```

```

nvar autofinish=autofinish
if(autofinish)
    PVB2FinishFHPathProfile("")
endif
end

```

C.4 Igor code van de interface en interfacefuncties.

```
#pragma rtGlobals=1      // Use modern global access method.

Function CreateMAPtraceInterface()

...

ControlBar 160

//block "new trace"
GroupBox newtracebox,pos={5,6},size={216,70}
GroupBox newtracebox help={"Choose One of the three possibilities to get a new trace"}
Button selectmanual,pos={94,10},size={120,20},proc=PVB2ImNewLineProfileProc,title="Select"
Button drawmanual,pos={94,31},size={120,20},proc=PVB2DrawImNewLineProfileProc,title="Draw"
Button AtoBauto,pos={94,52},size={120,20},proc=ABtraceButtonCtrlProc,title="A to B auto"
PopupMenu Nparam,pos={12,52},size={55,20},proc=NparamPopupMenuCtrlProc
PopupMenu Nparam,help={"Maximal angle"}
PopupMenu Nparam,mode=1,popvalue="auto",value= #"\"auto;0∞;45∞;63∞;72∞;76∞;79∞;81∞;82∞;83∞;84∞;85∞;\""
CheckBox pinning,disable=2,pos={12,33},size={31,14},title="pin",value= 0
CheckBox stationary,pos={12,14},size={62,14},title="stationary",value=0
CheckBox stationary,help={"marks a stationary one"}
CheckBox stationary,variable= root:Packages:PVB2ImProcess:LineProfile:gstationary
TitleBox newtracetitlebox,pos={19,0},size={146,12},title="New Trace",frame=0
ValDisplay valdisp0,pos={68,56},size={20,14}
ValDisplay valdisp0,help={"Total number of horizontal pixels to search for maximum intensity"}
ValDisplay valdisp0,limits={0,0,0},barmisc={0,1000},value= #"0"

//block "editing"
GroupBox editingbox,pos={226,6},size={115,70}
GroupBox editingbox help={"Each new trace can be edited: first 'edit', end with 'finish'."}
Button startPathProfileButton,pos={233,10},size={100,20},proc=PVB2StartEditingPathProfile,title="Edit"
Button startPathProfileButton,help={"After clicking in this button edit the path drawn on the top image. Click in the Finished button when you are done."}
Button remove,pos={233,31},size={100,20},proc=PVB2LineProfileRemoveButtonProc,title="Remove"
```

```
Button remove,help={"Removes profile lines (if any) from target image."}
Button finishPathProfileButton,pos={233,52},size={100,20},proc=PVB2FinishFHPATHProfile,title="Finish"
Button finishPathProfileButton,help={"Click in this button to terminate the path editing mode."}
TitleBox editingtitlebox,pos={267,-1},size={30,12},title="Editing",frame=0

//block "saving"
GroupBox savingbox,pos={346,6},size={161,70}
GroupBox savingbox help={"Pick a color and save the trace."}
Button saveTrace,pos={354,13},size={87,20},proc=Save_trace,title="Save Trace"
Button saveTrace,help={"Click to save current profile and add 2 graph."}
variable/G red=65535, green=0, blue=0/put initial color on red. Program uses globals red,green,blue in root datafolder.
PopupMenu Colorchoice,pos={450,13},size={50,20},proc=Colorchoice
PopupMenu Colorchoice,mode=1,popColor= (red,green,blue),value= #"\"*COLORPOP*\""
SetVariable width,pos={355,46},size={90,15},proc=PVB2LineProfileWidthSetVarProc,title="width"
SetVariable width,help={"Number of rows or columns to average."},format="%g"
SetVariable width,limits={0,inf,0.5},value= root:Packages:PVB2ImProcess:LineProfile:width
TitleBox savingtitlebox,pos={360,0},size={28,12},title="Saving",frame=0

// auto settings
SetVariable setvarInterpolateFactor,pos={24,130},size={162,16},bodyWidth=35,title="Linear Interpolation Factor"
SetVariable setvarInterpolateFactor,help={"Linear interpolation or upsampling results in more points. 1 means no linear interpolation."}
SetVariable setvarInterpolateFactor,limits={1,20,1},value= _NUM:1
SetVariable setvarDownSampleFactor,pos={53,108},size={133,16},bodyWidth=35,title="Downsample Factor"
SetVariable setvarDownSampleFactor,help={"Downsampling results in less points. 1 means no downsampling."}
SetVariable setvarDownSampleFactor,limits={1,50,1},value= _NUM:1
GroupBox autosettings,pos={5,89},size={502,68}
TitleBox newtracetitlebox1,pos={226,81},size={63,13},title="Auto Settings"
TitleBox newtracetitlebox1,frame=0
GroupBox group0,pos={17,99},size={270,53}
GroupBox group1,pos={294,101},size={108,51}
TitleBox title0,pos={34,93},size={53,13},title="Decimation",fSize=6,frame=0
SetVariable setvar0,pos={303,110},size={84,16},bodyWidth=35,title="box width"
SetVariable setvar0,help={"Width in timepixels for the box of moving average. 1 means no moving average."}
```

```

SetVariable setvar0,limits={1,50,1},value= _NUM:1
PopupMenu popup0,pos={205,127},size={69,21},help={"Smoothing method"}
PopupMenu popup0,mode=1,popvalue="Average",value= #"\Average;Hanning\"
PopupMenu popup0,disable=2
CheckBox check0,pos={205,109},size={68,14},title="Smoothing"
CheckBox check0,help={"Activate decimation by smoothing: remaining points will be the result of specified smoothing method on decimated points."}
CheckBox check0,value= 0,proc=smoothingboxctrl
SetVariable setvar1,pos={306,130},size={81,16},bodyWidth=35,title="iterations"
SetVariable setvar1,help={"How many times the boxcar moves over the whole trace."}
SetVariable setvar1,limits={1,32766,1},value= _NUM:1
TitleBox title2,pos={307,92},size={77,13},title="Moving average",frame=0
variable/G autofinish
CheckBox check1,pos={417,132},size={66,14},title="auto finish",fSize=12
CheckBox check1 variable=autofinish
CheckBox check1,help={"Automatically leave edit mode for easier inspection of the trace."}
CheckBox check2,pos={417,109},size={61,14},title="Edit local"
CheckBox check2,help={"Move both cursors to local region and adapt local trace."}
CheckBox check2,proc=localEditCtrl

```

```
SetWindow kwTopWin,hook=PVB2ImageLineProfileWindowProc
```

```
PVB2ImNewLineProfileProc("")
```

```
End
```

```
*****
```

```
Function ABtraceButtonCtrlProc(ctrlName):ButtonControl
```

```

string ctrlName
ControllInfo Nparam
variable V_ValueNparam=V_Value
ControllInfo setvarDownSampleFactor
variable downsamplfactor=V_Value
ControllInfo setvarInterpolateFactor
variable upsamplfactor=V_Value
variable decbysmth=0
ControllInfo check0
if(V_Value)
ControllInfo popup0
decbysmth=V_Value
endif
ControllInfo setvar0
variable boxcarwidth=V_Value
ControllInfo setvar1
variable iterations=V_Value

SVAR mapname=root:MAPS:g_selectedmap
wave w=root:MAPS:$mapname

variable temp,i

if (V_ValueNparam==1)
temp=Interpath(w,downsamplfactor,upsamplfactor,decbysmth,boxcarwidth,iterations)
for(i=0;i<51&&temp==2;i+=1)
ControllInfo valdisp0
temp=Interpath(w,downsamplfactor,upsamplfactor,decbysmth,boxcarwidth,iterations,n=(V_Value+2))
endfor
if(i==51&&temp==2)
print "To hard to extract a trace."
Beep
endif

```



```

else
    temp=Interpath(w,downsamplefactor,upsamplefactor,decbysmth,boxcarwidth,iterations,n=(V_ValueNparam*2-3))
    if(temp==2)
        print "To hard to extract a trace."
        Beep
    endif
endif

End
*****
Function NparamPopupMenuCtrlProc(ctrlName,popNum,popStr) : PopupMenuControl
String ctrlName
Variable popNum // which item is currently selected (1-based)
String popStr // contents of current popup item as string

ValDisplay valdisp0 value= _NUM:(popNum*2-3)

End
*****
Function smoothingboxctrl(ctrlName,checked) : CheckBoxControl
String ctrlName
Variable checked // 1 if selected, 0 if not

PopupMenu popup0,disable=2
if(checked)
PopupMenu popup0,disable=0
endif

End
*****
Function localEditCtrl(ctrlName,checked) : CheckBoxControl
String ctrlName
Variable checked // 1 if selected, 0 if not
wave trace,saved_trace
variable row,rowsInWave,a

```

```

if(checked)
PVB2LineProfileRemoveButtonProc("")
duplicate trace,saved_trace
ABtraceButtonCtrlProc("")
else
a=floor(trace[0][1])
cb
findvalue/V=(a) saved_trace
a-=1
while(V_Value==-1)
rowsInWave=dimsz(saved_trace,0)
row=V_value-rowsInWave
duplicate saved_trace,part1
redimension/N=(row,3) part1
concatenate/NP=0 {trace},part1
if(dimsz(saved_trace,0)>1)
Reverse/DIM=0 saved_trace
endif
a=ceil(trace[dimsz(saved_trace,0)-1][1])
cb
findvalue/V=(a) saved_trace
a+=1
while(V_Value==-1)
row=V_value-rowsInWave
redimension/N=(row,3) saved_trace
if(dimsz(saved_trace,0)>1)
Reverse/DIM=0 saved_trace
endif
concatenate/NP=0 {saved_trace},part1
duplicate/O part1,trace

killwaves saved_trace,part1
portautotrace(trace)
endif

End
*****

```

```

if (Datafolderexists("root:particle_traces")) //auto-particle number. by MM
string existingParticlesList=DataFolderDir(2,root:particle_traces)
do
partnumb+=1
while(stringmatch(existingParticlesList, "*P#" + num2str(partnumb) + "**"))
endif

```

C.5 Code die automatisch een uniek nummer suggereert bij het opslaan van een pad.

C.6 Overzicht van de gemaakte fouten (absoluut verschil met ideale waarden) per mitochondrion, per parameter voor elke test.

Persoon A								
	1	2	3	4	5	6	7	Gemiddelde
startposition	0	0,14668	0,08619	0,21926	0,15273	0,1739	0,0257	0,11
endposition	0	0,14668	0,04688	0,24043	0,08619	0,12853	0,20111	0,12
starttime	1,50E-32	1,50E-32	0	0	0	0	0	0,00
endtime	0	0	0	0	0	0	0	0,00
net displacement	0	0	0,039	0,022	0,239	0,302	0,176	0,11
span	0	0	0,162	0,121	0,63	0,012	0,266	0,17
distance antero	0	0	0,205	0,1	0,418	0,012	0,09	0,12
distance retro	0	0	0,044	0,022	0,214	0	0,176	0,07
totaltime	0	0	0	0	0	0	0	0,00
'average'speed	0	0	0,001	0	0,004	0,005	0,003	0,00
topspeedantero	0	0	0,00401	0	0,05701	0,24038	0,16789	0,07
topspeedretro	0	0	0,08605	0,00891	0,09995	0,08753	0,57409	0,12
avganterospeed	0	0	0,03303	0	0,04	0,02994	0,0043	0,02
avgretrospeed	0	0	0,02759	0,00189	0,01564	0,04714	0,03437	0,02
timestill	0	0	2	0	2	0	0	0,57
timeantero	0	0	1	0	0	2	1	0,57
time 0>v<1 um/s	0	0	1	0	1	4	1	1,00
time 1>v<2 um/s	0	0	0	0	1	2	0	0,43
time v>2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
timeretro	0	0	1	0	2	2	1	0,86
time -1>v<0 um/s	0	0	1	0	2	2	2	1,00
time -2>v<-1 um/s	0	0	0	0	0	0	1	0,14
time v<-2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
total distance traveled antero	0	0	0,635	0	1,08	0,71	0,455	0,41
total distance traveled retro	0	0	0,625	0,07	0,93	0,39	0,565	0,37
total distance traveled	0	0	1,26	0,07	2,01	1,1	1,02	0,78
total time traveled	0	0	2	0	2	0	0	0,57
Avg speed -dir indep	0	0	0,03019	0,00189	0,02299	0,01618	0,015	0,01
Avg speed including stops	0	0	0,02	0,00101	0,02957	0,01594	0,01478	0,01
# direction changes	0	0	0	0	1	2	0	0,43
Gemiddelde	5E-34	0,01	0,38	0,03	0,57	0,58	0,33	0,27

Persoon B								
	1	2	3	4	5	6	7	Gemiddelde
startposition	0,13313	0,01024	0,07988	0,10035	0,12494	0,12083	0,39119	0,14
endposition	0,13313	0,01024	0,14541	0,43625	0,0553	0,07169	0,36661	0,17
starttime	1,50E-32	1,50E-32	0	0	0	0	0	0,00
endtime	0,96085	0,82832	0,35542	0	0	0	0	0,31
net displacement	0	0	0,066	0,537	0,07	0,192	0,758	0,23
span	0	0	0,095	0,537	0,016	0,041	0,315	0,14
distance antero	0	0	0,156	0	0,196	0,041	0,443	0,12
distance retro	0	0	0,061	0,537	0,181	0	0,758	0,22
totaltime	1	1	0	0	0	0	0	0,29
'average'speed	0	0	0,001	0,008	0,001	0,003	0,011	0,00
topspeedantero	0	0	0,21661	0	0,14267	0,01823	0,06591	0,06
topspeedretro	0	0	0,00667	0,02277	0,31318	0,00021	0,03667	0,05
avganterospeed	0	0	0,01346	0	0,00285	0,01994	0,02106	0,01
avgretrospeed	0	0	0,01237	0,00973	0,00918	0,05214	0,00343	0,01
timestill	1	1	1	0	4	0	1	1,14
timeantero	0	0	1	0	3	2	1	1,00
time 0>v<1 um/s	0	0	1	0	1	8	1	1,57
time 1>v<2 um/s	0	0	0	0	2	6	0	1,14
time v>2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
timeretro	0	0	2	0	1	2	0	0,71
time -1>v<0 um/s	0	0	2	0	1	2	11	2,29
time -2>v<-1 um/s	0	0	0	0	2	0	11	1,86
time v<-2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
total distance traveled antero	0	0	0,185	0	1,125	0,17	0,365	0,26
total distance traveled retro	0	0	0,04	0,36	0,505	0,32	0,12	0,19
total distance traveled	0	0	0,225	0,36	1,63	0,49	0,485	0,46
total time traveled	0	0	1	0	4	0	1	0,86
Avg speed -dir indep	0	0	0,0007	0,00973	0,00779	0,00721	0,01411	0,01
Avg speed including stops	0	0	0,00319	0,00536	0,02348	0,00725	0,00725	0,01
# direction changes	0	0	0	1	0	2	0	0,43
Gemiddelde	0,11	0,09	0,32	0,13	0,75	0,79	1,01	0,46

Persoon C								
	1	2	3	4	5	6	7	Gemiddelde
startposition	0	0,01129	0,03671	0,11285	0,05711	0,0231	0,12696	0,05
endposition	0	0,21824	0,05414	0,15908	0,21619	0,13733	0,02001	0,11
starttime	1,50E-32	1,50E-32	0	0	0	0	0	0,00
endtime	0	0,063	0	0	0	0	0	0,01
net displacement	0	0,207	0,018	0,272	0,274	0,114	0,147	0,15
span	0	0,207	0,237	0,272	0,059	0,435	0,014	0,17
distance antero	0	0	0,038	0	0,126	0,435	0,161	0,11
distance retro	0	0,207	0,199	0,272	0,068	0	0,147	0,13
totaltime	0	0	0	0	0	0	0	0,00
'average'speed	0	0,003	0	0,004	0,004	0,001	0,002	0,00
topspeedantero	0	0	0,14067	0	0,37351	0,10649	0,08921	0,10
topspeedretro	0	0	0,02233	0,00586	0,07773	0,00101	0,00567	0,02
avganterospeed	0	0	0,02152	0	0,09352	0,00294	0,00212	0,02
avgretrospeed	0	0	0,00893	0,02148	0,03247	0,09143	0,00543	0,02
timestill	0	0	8	1	7	1	0	2,43
timeantero	0	0	7	0	11	1	0	2,71
time 0>v<1 um/s	0	0	7	0	8	1	0	2,29
time 1>v<2 um/s	0	0	0	0	3	0	0	0,43
time v>2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
timeretro	0	0	1	1	4	2	0	1,14
time -1>v<0 um/s	0	0	1	1	4	2	0	1,14
time -2>v<-1 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
time v<-2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
total distance traveled antero	0	0	0,205	0	0,885	0,615	0,07	0,25
total distance traveled retro	0	0	0,525	0,055	0,24	0,23	0,19	0,18
total distance traveled	0	0	0,73	0,055	1,125	0,845	0,12	0,41
total time traveled	0	0	8	1	7	1	0	2,43
Avg speed -dir indep	0	0	0,01172	0,02148	0,01237	0,019	0,00176	0,01
Avg speed including stops	0	0	0,01014	0,00406	0,01565	0,01232	0,00159	0,01
# direction changes	0	0	1	1	1	0	0	0,43
Gemiddelde	0,00	0,03	1,18	0,21	1,62	0,37	0,04	0,49

Persoon D

	1	2	3	4	5	6	7	Gemiddelde
startposition	0,0	0,22652	0,273941	0,1294403	0,27394	0,0219727	0,0464554	0,14
endposition	0,0	0,04854	0,027235	0,2103405	0,62637	0,7897797	0,1842651	0,27
starttime	0,0	1,50E-32	0	0	0	0,045316	0	0,01
endtime	0,0	0	0,5864716	0,125	0,27605	0,4312668	0	0,20
net displacement	0,0	0,178	0,3010001	0,3389988	0,901	0,7679996	0,1380005	0,37
span	0,0	0,178	0,0750003	0,1609993	0,328	0,4169998	0,1149998	0,18
distance antero	0,0	0,178	0,23	0,178	0,245	0,4169998	0,0230002	0,18
distance retro	0,0	0	0,3059998	0,3389988	0,572	0	0,1380005	0,19
totaltime	0,0	0	1	0	0	0	0	0,14
'average'speed	0,0	0,003	0,004	0,00500003	0,013	0,011	0,002	0,01
topspeedantero	0,0	0	0,0020977	0	0,22985	0,5885725	0,0256133	0,12
topspeedretro	0,0	0	0,153093	0,00412911	0,17722	0,0245545	1,262212	0,23
avganterospeed	0,0	0	0,0395076	0	0,08738	0,0344946	0,028057	0,03
avgretrospeed	0,0	0	0,0062216	0,0450424	0,01405	0,153	0,0444589	0,04
timestill	0,0	0	0	2	5	1	1	1,29
timeantero	0,0	0	2	0	8	3	1	2,00
time 0>v<1 um/s	0,0	0	2	0	9	2	1	2,00
time 1>v<2 um/s	0,0	0	0	0	1	1	0	0,29
time v>2 um/s	0,0	0	0	0	0	0	0	0,00
timeretro	0,0	0	1	2	3	2	2	1,43
time -1>v<0 um/s	0,0	0	1	2	3	2	8	2,29
time -2>v<-1 um/s	0,0	0	0	0	0	0	5	0,71
time v<-2 um/s	0,0	0	0	0	0	0	1	0,14
total distance traveled antero	0,0	0	0,6200001	0	0,17	0,6749992	0,6449995	0,30
total distance traveled retro	0,0	0	0,0250001	0,08000183	0,115	2,58	0,2600002	0,44
total distance traveled	0,0	0	0,6450005	0,08000183	0,055	3,255001	0,3850002	0,63
total time traveled	0,0	0	1	2	5	1	1	1,43
Avg speed -dir indep	0,0	0	0,0150909	0,0450424	0,02045	0,053928	0,0011282	0,02
Avg speed including stops	0,0	0	0,0122975	0,00101453	0,00043	0,0472464	0,0053623	0,01
# direction changes	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	2,0	0,0	0,43
Gemiddelde	0,00	0,03	0,38	0,32	1,30	0,81	0,78	0,52

Persoon E

	1	2	3	4	5	6	7	Gemiddelde
startposition	0	0,16597	0,32027	0,36613	0,13678	0,36446	0,17181	0,22
endposition	0	0,02836	0,19349	0,08507	0,32026	0,19849	0,17847	0,14
starttime	1,50E-32	1,50E-32	0	0	0	0	0	0,00
endtime	0	0	0	0	0,54017	0	0	0,08
net displacement	0	0,138	0,126	0,281	0,457	0,166	0,007	0,17
span	0	0,275	0,307	0,005	0,297	0,437	0,046	0,20
distance antero	0	0,275	0,438	0,275	0,06	0,437	0,053	0,22
distance retro	0	0	0,131	0,281	0,357	0	0,007	0,11
totaltime	0	0	0	0	1	0	0	0,14
'average'speed	0	0,002	0,002	0,004	0,005	0,002	0,001	0,00
topspeedantero	0	0,01546	0,20868	0	0,33274	0,20812	0,08834	0,12
topspeedretro	0	0	0,11315	0,01836	0,05071	0,0647	0,0123	0,04
avganterospeed	0	0,015	0,05087	0	0,09326	0,05318	0,00364	0,03
avgretrospeed	0	0	0,05353	0,0237	0,02514	0,11706	0,004	0,03
timestill	0	1	11	1	6	0	0	2,71
timeantero	0	1	2	0	11	5	0	2,71
time 0>v<1 um/s	0	1	2	0	10	6	0	2,71
time 1>v<2 um/s	0	0	0	0	1	1	0	0,29
time v>2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
timeretro	0	0	13	1	4	5	0	3,29
time -1>v<0 um/s	0	0	13	1	4	5	0	3,29
time -2>v<-1 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
time v<-2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
total distance traveled antero	0	0,015	0,87	0	0,895	0,445	0,12	0,34
total distance traveled retro	0	0	0,585	0,025	0,02	0,635	0,14	0,20
total distance traveled	0	0,015	1,455	0,025	0,915	1,08	0,02	0,50
total time traveled	0	1	11	1	7	0	0	2,86
Avg speed -dir indep	0	0,015	0,00866	0,0237	0,01546	0,01588	0,00029	0,01
Avg speed including stops	0	0,00159	0,02014	0,00058	0,00923	0,01565	0,00014	0,01
# direction changes	0	0	0	0	1	2	0	0,43
Gemiddelde	0,00	0,17	1,90	0,18	1,65	0,94	0,03	0,69

Auto alle tools

	1	2	3	4	5	6	7	Gemiddelde
startposition	0,01551	0,01551	0	0	0	0	0,6472	0,10
endposition	0,01551	0,01551	0,3236	0	0,3236	0,3236	0	0,14
starttime	1,50E-32	1,50E-32	0	0	0	0	0	0,00
endtime	0,58635	0,13529	0	0	0	0	0	0,10
net displacement	0	0	0,324	0	0,323	0,324	0,648	0,23
span	0	0	0,319	0,324	0,65	0,324	0	0,23
distance antero	0	0	0	0,324	0,324	0,324	0,648	0,23
distance retro	0	0	0,319	0	0,327	0	0,648	0,18
totaltime	1	0	0	0	0	0	0	0,14
'average'speed	0	0	0,004	0	0,005	0,004	0,01	0,00
topspeedantero	0	0	0,2367	0,03452	0,03611	0	0,16736	0,07
topspeedretro	0	0	0,2132	0,3236	0,60216	0,15514	0	0,18
avganterospeed	0	0	0,00579	0,025	0,01977	0,01482	0,00455	0,01
avgretrospeed	0	0	0,0075	0,0262	0,06276	0,03083	0,00086	0,02
timestill	1	0	5	5	2	0	0	1,86
timeantero	0	0	5	6	5	0	0	2,29
time 0>v<1 um/s	0	0	5	6	5	2	0	2,57
time 1>v<2 um/s	0	0	0	0	0	2	0	0,29
time v>2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
timeretro	0	0	0	1	3	0	0	0,57
time -1>v<0 um/s	0	0	0	7	4	0	0	1,57
time -2>v<-1 um/s	0	0	0	6	1	0	0	1,00
time v<-2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
total distance traveled antero	0	0	0,455	0,15	1,385	0,83	0,15	0,42
total distance traveled retro	0	0	0,24	0,115	1,395	0,37	0,03	0,31
total distance traveled	0	0	0,695	0,265	2,78	1,2	0,18	0,73
total time traveled	0	0	5	5	2	0	0	1,71
Avg speed -dir indep	0	0	0,00377	0,09229	0,03521	0,01765	0,00265	0,02
Avg speed including stops	0	0	0,01029	0,00522	0,04058	0,01739	0,00261	0,01
# direction changes	0	0	1	0	0	0	0	0,14
Gemiddelde	0,09	0,01	0,81	1,26	1,01	0,26	0,10	0,50

Auto enkel preparameter

	1	2	3	4	5	6	7	Gemiddelde
startposition	0	0	0	0	0	0	0	0,00
endposition	0	0	0	0,3236	0,3236	0	0,3236	0,14
starttime	1,50E-32	1,50E-32	0	0	0	0	0	0,00
endtime	0	0	0	0	0	0	0	0,00
net displacement	0	0	0	0,324	0,323	0	0,324	0,14
span	0	0	0,319	0,648	1,901	0,324	0,324	0,50
distance antero	0	0	0	0,324	0,324	0,324	0	0,14
distance retro	0	0	0,319	0,324	1,578	0	0,324	0,36
totaltime	0	0	0	0	0	0	0	0,00
'average'speed	0	0	0	0,005	0,005	0	0,005	0,00
topspeedantero	0	0	0,20625	0,03452	0,1043	0	0,16736	0,07
topspeedretro	0	0	0,2132	0,3236	0,34979	0,15514	0,29162	0,19
avganterospeed	0	0	0,00889	0,025	0,00948	0,01482	0,00482	0,01
avgretrospeed	0	0	0,00502	0,0262	0,10224	0,00167	0,01937	0,02
timestill	0	0	7	5	5	0	0	2,43
timeantero	0	0	5	6	3	0	1	2,14
time 0>v<1 um/s	0	0	5	6	2	2	1	2,29
time 1>v<2 um/s	0	0	0	0	1	2	0	0,43
time v>2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
timeretro	0	0	2	1	8	0	1	1,71
time -1>v<0 um/s	0	0	2	7	9	0	3	3,00
time -2>v<-1 um/s	0	0	0	6	1	0	2	1,29
time v<-2 um/s	0	0	0	0	0	0	0	0,00
total distance traveled antero	0	0	0,365	0,15	1,495	0,83	0,145	0,43
total distance traveled retro	0	0	0,29	0,115	1,19	0,02	0,055	0,24
total distance traveled	0	0	0,655	0,265	2,685	0,81	0,2	0,66
total time traveled	0	0	7	5	5	0	0	2,43
Avg speed -dir indep	0	0	0,01016	0,09229	0,07303	0,01191	0,00294	0,03
Avg speed including stops	0	0	0,00899	0,00522	0,04	0,01174	0,0029	0,01
# direction changes	0	0	1	0	2	0	0	0,43
Gemiddelde	5E-34	0,00	1,05	1,30	1,55	0,22	0,34	0,64

LITERATUURLIJST

1. MORAIS V.A., DE STROOPER B.; *Mitochondria dysfunction and neurodegenerative disorders: cause or consequence*. J. Alzheimers Dis.; 20 Suppl 2. (2010)
2. DE VOS KURT J., GRIERSON ANDREW J., ACKERLEY STEVEN, MILLER CHRISTOPHER C. J.; *Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases*. Annu. Rev. Neurosci. 31:151 - 173 (2008)
3. WINGATE D., HONGO M., KELLOW J., LINDBERG G., SMOUT A.; *Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification*. J. Gastroenterol Hepatol.; 17. (suppl): S1 - S14. (2002)
4. BORON WALTER F., BOULPAEP EMILE L.; *Medical Physiology*. Elsevier Saunders. p. 883. ISBN 978-1-4160-2328-9. (2005)
5. FURNESS JB., COSTA M.; *Types of nerves in the enteric nervous system*. Neuroscience.; 5(1): 1-20. (1980)
6. SILVERTHORN DEE U.; *Human Physiology*. Pearson Education, Inc., San Francisco, CA 94111. (2007)
7. VANDEN BERGHE P., TACK J., COULIE B., ANDRIOLI A., BELLON E., AND JANSSENS J.; *Synaptic transmission induces transient Ca^{2+} concentration changes in cultured myenteric neurons*. Neurogastroenterol Motil 12: 117 - 124. (2000)
8. SMITH TERENCE K., KANG SOK HAN and VANDEN BERGHE PIETER, *Calcium channels in enteric neurons - Current Opinion in Pharmacology*, 3:588 - 593. (2003)
9. NEUNLIST, PETERS, SCHEMANN; *Multisite optical recording of excitability in the enteric nervous system*. Neurogastroenterology & Motility, 11: 393 - 402. (1999)
10. DETMER S. A., CHAN D. C.; *Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 8, 870 - 879. (2007)
11. SKULACHEV V.P., BAKEEVA L.E., CHERNYAK B.V., DOMNINA L.V., MININ A.A., PLETJUSHKINA O.Y., SAPRUNOVA V.B., SKULACHEV I.V., TSYPLENKOVA V.G., VASILIEV J.M., YAGUZHINSKY L.S., ZOROV D.B.; *Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis*. Mol Cell Biochem 256 - 257: 341 - 358. (2004)
12. CHIH C.P., ROBERTS E.L. JR.; *Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis*. J Cereb Blood Flow Metab 23: 1263 - 1281. (2003)
13. SIESJO B.K.; *Brain Energy Metabolism*. New York: Wiley. (1978)
14. FRIEL D.D.; *Mitochondria as regulators of stimulus-evoked calcium signals in neurons*. Cell Calcium, 28:307-316. (2000)

15. DUCHEN M.R.; *Mitochondria and Ca(2R)in cell physiology and pathophysiology.* Cell Calcium, 28:339 - 348. (2000)
16. BARON K.T., WANG G.J., PADUA R.A., CAMPBELL C., THAYER S.A.; *NMDA-evoked consumption and recovery of mitochondrially targeted aequorin suggests increased Ca²⁺ uptake by a subset of mitochondria in hippocampal neurons.* Brain Res 993: 124 - 132. (2003)
17. DAVID G., TALBOT J., BARRETT E.F.; *Quantitative estimate of mitochondrial [Ca²⁺] in stimulated motor nerve terminals.* Cell Calcium. 33: 197 - 206. (2003)
18. PIVOVAROVA N.B., HONGPAISAN J., ANDREWS S.B., FRIEL D.D.; *Depolarization-induced mitochondrial Ca²⁺ accumulation in sympathetic neurons: spatial and temporal characteristics.* J Neurosci 19: 6372 - 6384. (1999)
19. Kirichok et al., Kirichok Y., Krapivinsky G. and Clapham D.E.; *The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel,* Nature 427, pp. 360 - 364. (2004)
20. GUNTER T.E., PFEIFFER D.R.; *Mechanisms by which mitochondria transport calcium.* Am. J. Physiol. 258 (Cell Physiol. 27): C755 - C786. (1990)
21. MITCHELL P.; *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.* Nature 191: 144 - 148. (1961)
22. CROMPTON M.; *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.* Biochem J.; 341 (Pt 2): 233 - 249. (1999)
23. CAMPANELLA MICHELANGELO, PINTON PAOLO, RIZZUTO ROSARIO; *Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease.* Biol. Res., Santiago, v. 37, n. 4, (2004)
24. DAVIS A.F., CLAYTON D.A.; *In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells.* J Cell Biol 135: 883 - 893. (1996)
25. MULLER M., MIRONOV S.L., IVANNIKOV M.V., SCHMIDT J., RICHTER D.W.; *Mitochondrial organization and motility probed by two-photon microscopy in cultured mouse brainstem neurons.* Exp Cell Res 303: 114 - 127. (2005)
26. YAFFE M.P.; *Dynamic mitochondria.* Nat Cell Biol 1: E149 - E150. (1999)
27. CHAN D. C.; *Mitochondrial fusion and fission in mammals.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22, 79 - 99. (2006)
28. OKAMOTO K., SHAW J. M.; *Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes.* Annu. Rev. Genet. 39, 503 - 36. (2005)
29. HOLLENBECK P. J., SAXTON W. M.; *The axonal transport of mitochondria.* J. Cell Sci. 118, 5411 - 5419. (2005)

30. MIRONOV S.L.; *Spontaneous and evoked neuronal activities regulate movements of single neuronal mitochondria*. Synapse 59: 403 - 411. (2006)
31. OVERLY C.C., RIEFF H.I., HOLLENBECK P.J.; *Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons*. J Cell Sci 109: 971 - 980. (1996)
32. MORRIS R. L., HOLLENBECK P. J.; *Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons*. J. Cell Biol. 131, 1315 - 1326. (1995)
33. LI Z., OKAMOTO K., HAYASHI Y., SHENG M.; *The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses*. Cell 119, 873 - 887. (2004)
34. MILLER K. E., SHEETZ M. P.; *Axonal mitochondrial transport and potential are correlated*. J. Cell Sci. 117, 2791 - 2804. (2004)
35. PILLING A. D., HORIUCHI D., LIVELY C. M., SAXTON W. M.; *Kinesin-1 and dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons*. Mol. Biol. Cell 17, 2057 - 2068. (2006)
36. VANDEN BERGHE P., HENNIG G.W., SMITH T.K.; *Characteristics of intermittent mitochondrial transport in guinea pig enteric nerve fibers*, Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol. 286, pp. G671 - G682. (2004)
37. KOVACS R., KARDOS J., HEINEMANN U., KANN O.; *Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures*. J Neurosci 25: 4260 - 4269. (2005)
38. DE VOS K.J., SABLE J., MILLER K.E., SHEETZ M.P.; *Expression of phosphatidylinositol (4,5) biphosphate-specific pleckstrin homology domains alters direction but not the level of axonal transport of mitochondria*. Mol Biol Cell 14: 3636 - 3649. (2003)
39. OVERLY C.C., RIEFF H.I., HOLLENBECK P.J.; *Axonal and dendritic organelle transport in hippocampal neurons: differences in organization and behavior*. J Cell Sci 109, 971 - 980. (1996)
40. MORRIS R. L., HOLLENBECK P. J.; *The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth*. J. Cell Sci. 104, 917 - 927. (1993)
41. LORENZ T., WILLARD M.; *Subcellular fractionation of intra-axonally transport polypeptides in the rabbit visual system*. Proc Natl Acad Sci USA 75, 505-509. (1978)
42. BLAKER W. D., GOODRUM J. F., MORELL P.; *Axonal transport of the mitochondria-specific lipid, diphosphatidylglycerol, in the rat visual system*. J Cell Biol 89, 579 - 584. (1981)

43. LIGON L. A., STEWARD O.; *Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons.* J. Comp. Neurol. 427, 351 - 361. (2000)
44. PATHAK DIVYA, SEPP KATHARINE J., HOLLENBECK PETER J.; *Evidence That Myosin Activity Opposes Microtubule-Based Axonal Transport of Mitochondria.* Journal of Neuroscience. 30(26):8984 - 8992. June 30. (2010)
45. NANGAKU M., SATO-YOSHITAKE R., OKADA Y., NODA Y., TAKEMURA R., YAMAZAKI H., HIROKAWA N.; *KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria.* Cell 79, 1209 - 1220. (1994)
46. GUO X. ET AL.; *The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to Drosophila synapses.* Neuron 47, 379 - 393 (2005).
47. STOWERS R. S., MEGEATH L. J., GORSKA-ANDRZEJAK J., MEINERTZHAGEN I. A., SCHWARZ, T. L.; *Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein.* Neuron 36, 1063 - 1077. (2002)
48. VERSTREKEN P. ET AL.; *Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions.* Neuron 47, 365 - 378. (2005)
49. BRICKLEY K. ET AL.; *GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin,* J. Biol. Chem. 280, pp. 14723 - 14732. (2005)
50. SMIH M.J. ET AL.; *Mapping the GRIF-1 binding domain of the kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in the anterograde trafficking of cargoes,* J. Biol. Chem 281, pp. 27216 - 27228. (2006)
51. SATO-YOSHITAKE R., YORIFUJI H., INAGAKI M., HIROKAWA N.; *The phosphorylation of kinesin regulates its binding to synaptic vesicles.* J Biol Chem 267, 23930 - 23936. (1992)
52. MC ILVAIN JR. J. M., BURKHARDT J. K., HAMM-ALVAREZ S., ARGON Y., SHEETZ M. P.; *Regulation of kinesin activity by phosphorylation of kinesin-associated proteins.* J Biol Chem 269, 19176 - 19182. (1994)
53. PFISTER K. K., SALATA J. F., WILLMAN D. M., VAUGHAN K. T., VALLEE R. B., TORRE E., LYE R. J., *Differential expression and phosphorylation of the 74-kDa intermediate chains of cytoplasmic dynein in cultured neurons and glia.* J Biol Chem 271, 1687 - 1694. (1996)
54. CHILCOTE T. J., JOHNSON K. A.; *Phosphorylation of Tetrahymena 22S dynein.* J Biol Chem 265, 17257 - 17266. (1990)
55. HAMASAKI T., BARKALOW K., RICHMOND J., SATIR P.; *cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in Paramecium.* Proc Natl Acad Sci USA 88, 7918 - 7922. (1991)

56. BARKALOW K., HAMASAKI T., SATIR P.; *Regulation of 22S dynein by a 29-kD light chain.* J Cell Biol 126, 727-735. (1994)
57. MATTHIES H. J. G., MILLER R. J., PALFREY H. C.; *Calmodulin binding to and cAMP-dependent phosphorylation of kinesin light chains modulate kinesin ATPase activity.* J Biol Chem 268, 11176 - 11187. (1993)
58. LEE K.-D., HOLLENBECK P. J.; *Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth.* J Biol Chem 270, 5600 - 5605. (1995)
59. DILLMAN J. F., PFISTER K. K.; *Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles.* J Cell Biol 127, 1671 - 1681. (1994)
60. SCHNAPP B. J., REESE T. S.; *Cytoplasmic structure in rapid-frozen axons.* J Cell Biol 94, 667 - 679. (1982)
61. BENSALOM G., REESE T. S.; *Ultrastructural observations on the cytoarchitecture of axons processed by rapid-freezing and freeze substitution.* J Neurocytol 14, 943 - 960. (1985)
62. SMITH D. S., JARLFORS U., CAYER M. L.; *Structural cross-bridges between microtubules and mitochondria in central axons of an insect (Periplaneta americana).* J Cell Sci 27, 255 - 272. (1977)
63. PANNESE E., PROCACCI P., LEDDA M., ARCIDIACONO G., FRATTOLA D., RIGAMONTI L.; *Association between microtubules and mitochondria in myelinated axons of Lacerta muralis. A quantitative analysis.* Cell Tiss Res 245, 1 - 8. (1986)
64. PRICE R. L., LASEK R. J., KATZM. J.; *Microtubules have special physical associations with smooth endoplasmic reticula and mitochondria in axons.* Brain Res 540, 209 - 216. (1991)
65. LINDEN M., NELSON B. D., LONCAR D., LETERRIER J. F.; *Studies on the interaction between mitochondria and the cytoskeleton.* J Bioenerg Biomem 21, 507 - 518. (1989)
66. LINDEN M., NELSON B. D., LETERRIER J. F.; *The specific binding of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) to the outer membrane of rat brain mitochondria.* Biochem J 261, 167 - 173. (1989)
67. JUNG D., FILLIOL D., MIEHE M., RENDON A.; *Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP 2 or TAU.* Cell Motil Cytoskel 24, 245 - 255. (1993)

68. LETERRIER J. F., RUSAKOV D. A., NELSON B. D., LINDEN M.; *Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro*. *Microscr Res Tech* 27, 233-261. (1994)
69. LETERRIER J. F., RUSAKOV D. A., LINDEN M.; *Statistical analysis of the surface distribution of microtubule-associated proteins (MAPs) bound in vitro to rat brain mitochondria and labelled by 10 nm gold-coupled antibodies*. *Bulletin de l'Association des Anatomistes* 78, 47 - 51. (1994)
70. Hollenbeck P.J.; *The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons*. *Front. Biosci.* 1, pp. d91 - d102. (1996)
71. BAYSAL K., JUNG D.W., GUNTER K.K., GUNTER T.E., BRIERLEY G.P.; *Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca²⁺/2Na⁺ exchanger*. *Am J Physiol Cell Physiol* 266: C800 - C808. (1994)
72. BRAND M.D.; *The stoichiometry of the exchange catalysed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter*. *Biochem J* 229: 161 - 166. (1985)
73. GUNTER K.K., ZUSCIK M.J., GUNTER T.E.; *The Na⁺-independent Ca²⁺ efflux mechanism of liver mitochondria is not a passive Ca²⁺/2H exchanger*. *J Biol Chem* 266: 21640 - 21648. (1991)
74. JUNG D.W., BAYSAL K., BRIERLEY G.P.; *The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral*. *J Biol Chem* 270: 672 - 678. (1995)
75. CHANG D. T., HONICK A. S., REYNOLDS I. J.; *Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons*. *J. Neurosci.* 26, 7035 - 7045. (2006)
76. Chada S. R., Hollenbeck P. J.; *Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria*. *Curr. Biol.* 14, 1272 - 1276. (2004)
77. BEREITER-HAHN J., VOTH M.; *Metabolic control of shape and structure of mitochondria in situ*. *Biol Cell* 47, 309 - 322. (1983)
78. RINTOUL G.L., FILIANO A.J., BROCARD J.B., KRESS G.J., REYNOLDS I.J.; *Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons*. *J Neurosci* 23: 7881 - 7888. (2003)
79. YI M., WEAVER D., HAJNOCZKY G.; *Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit*. *J Cell Biol* 167: 661 - 672. (2004)
80. FRIEL D.D., TSIEN R.W.; *An FCCP-sensitive Ca²⁺ store in bullfrog sympathetic neurons and its participation in stimulus-evoked changes in [Ca²⁺]_i*. *J Neurosci* 14: 4007 - 4024. (1994)

81. COLEGROVE S.L., ALBRECHT M.A., FRIEL D.D.; *Quantitative analysis of mitochondrial Ca²⁺ uptake and release pathways in sympathetic neurons. Reconstruction of the recovery after depolarization-evoked [Ca²⁺]_i elevations.* J Gen Physiol 115: 371 - 388. (2000)
82. BINDOKAS V.P., JORDAN J., LEE C.C., MILLER R.J.; *Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine.* J Neurosci 16: 1324 - 1336. (1996)
83. CARRIEDO S.G., SENSI S.L., YIN H.Z., WEISS J.H.; *AMPA exposures induce mitochondrial Ca²⁺ overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro.* J Neurosci 20: 240 - 250. (2000)
84. DUGAN L.L., SENSI S.L., CANZONIERO L.M., HANDRAN S.D., ROTHMAN S.M., LIN T.S., GOLDBERG M.P., CHOI D.W.; *Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate.* J Neurosci 15: 6377 - 6388. (1995)
85. REYNOLDS I.J., HASTINGS T.G.; *Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation.* J Neurosci 15: 3318 - 3327. (1995)
86. FISKUM G., MURPHY A.N., BEAL M.F.; *Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases.* J Cereb Blood Flow Metab 19: 351 - 369. (1999)
87. NICHOLLS D.G., BUDD S.L.; *Mitochondria and neuronal survival.* Physiol Rev 80: 315 - 360. (2000)
88. PERLSON E., MADAY S., FU M.M., MOUGHAMIAN A.J., HOLZBAUR E.L.; *Retrograde axonal transport: pathways to cell death?* Trends Neurosci. 33(7): 335 - 44. (2010)
89. DETMER S. A., CHAN D. C.; *Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations.* J. Cell Biol. 176, 405 - 414. (2007)
90. BALOH R. H., SCHMIDT R. E., PESTRONK A. MILBRANDT J.; *Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations.* J. Neurosci. 27, 422 - 430. (2007)
91. CAMILLERI M., COWEN T., KOCH T.R.; *Enteric neurodegeneration in ageing.* Neurogastroenterol Motil 20:185 - 196. (2008)
92. O'REILLY C.M., FOGARTY K.E., DRUMMOND R.M., TUFT R.A., WALSH J.V. JR. *Quantitative analysis of spontaneous mitochondrial depolarizations.* Biophys J 85: 3350 - 3357. (2003)

93. KANN O., KOVACS R.; *Mitochondria and neuronal activity*. Am J Physiol 292:C641 - C657. (2007)
94. KEIJ J.F., BELL-PRINCE C., STEINKAMP J.A.; *Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs*. Cytometry 39: 203 - 210. (2000)
95. BUCKMAN J.F., HERNANDEZ H., KRESS G.J., VOTYAKOVA T.V., PAL S., REYNOLDS I.J.; *MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants*. J Neurosci Methods 104:165-176. (2001)
96. JAKOBS S.; *High resolution imaging of live mitochondria*. Biochim Biophys Acta 1763: 561 - 575. (2006)
97. THOMAS C., DEVRIES P., HARDIN J., WHITE J.; *Four-dimensional imaging: computer visualization of 3D movements in living specimens*, Science 273, 603 - 607. (1996)
98. HAMMOND A.T., GLICK B.S.; *Raising the speed limits for 4D fluorescence microscopy*, Traffic 1, 935 - 940. (2000)
99. GERLICH D., ELLENBERG J., *4D imaging to assay complex dynamics in live specimens*, Nat. Cell Biol. S14 - S19. (2003)
100. ZHANG Y. ET AL.; *Automated neurite extraction using dynamic programming for high-throughput screening of neuron-based assays*. Neuroimage 35, 1502 - 1515. (2007)
101. Meijering E.; *Neuron Tracing in Perspective*, Cytometry Part A, vol. 77, n° . 7, pp. 693 - 704. (2010)
102. SHARP D. J., KURIYAMA R., ESSNER R., BAAS P. W.; *Expression of a minus-end-directed motor protein induces Sf9 cells to form axon-like processes with uniform microtubule polarity orientation*. J. Cell Sci 110, 2373 - 2380. (1997)

