

PRZYŻYCIOWE BADANIA NAD FUNKCJONOWANIEM MÓZGU PRZY UŻYCIU MIKROSKOPII SPIM

Michał Bazala, Justyna Jędrychowska, Jacek Kuźnicki (Warszawa)



Streszczenie

Dynamiczny rozwój inżynierii genetycznej i technologii optycznych pozwala na coraz dokładniejszą obserwację skomplikowanych procesów biologicznych *in vivo*. Stwarza to nowe możliwości poszukiwania terapii dla starzejącej się populacji ludzkiej, wśród której powszechniejsze stają się choroby neurodegeneracyjne. Mechanizmy leżące u podstaw chorób, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona mogą być analizowane bezpośrednio w odpowiednim modelu zwierzęcym, identyfikując interakcje w złożonym systemie tkanek i komórek oraz sprawdzając wpływ potencjalnych leków. Wnioski wynikające z takich obserwacji okazują się czasami inne, niż te wynikające z badań prowadzonych jedynie na hodowlach komórkowych. W poniższym opracowaniu podajemy przykłady naszych doświadczeń w oparciu o model ryby danio pręgowanego (*Danio rerio*), uzyskane przy pomocy ultranowoczesnego mikroskopu typu SPIM (ang. *single plane illumination microscopy*). Szybkość zbierania danych rzędu 100 Hz, wysoka rozdzielczość obrazu oraz niska fototoksyczność pozwalają na obrazowanie pracy mózgu przezroczystych larw ryby podczas długotrwałych eksperymentów przyżyciowych. Takie badania otwierają nowe możliwości do głębszego poznania funkcjonowania układu nerwowego, zrozumienia jego dysfunkcji i identyfikacji potencjalnych leków.

Abstract

The dynamic development of genetic and optical engineering leads to more precise observation of biological processes *in vivo*. This opens new opportunities for developing successful therapies of neurodegenerative diseases that become serious problem among the aging population. The mechanisms underlying diseases such as Alzheimer's and Parkinson's may now be analysed directly in particular animal model, identifying interactions in a complex system of tissues and cells and impact of chemicals as potential drugs. The conclusions of such observations sometimes appear to be different than those from studies conducted using only cell cultures. In this article we present examples of our research, based on the zebrafish (*Danio rerio*) model using the cutting edge SPIM (selective plane illumination microscopy) microscope. It allows imaging the brain of transparent larval fish during prolonged experiments, since its rate of acquisition is approximately 100 Hz, it has high image resolution and low phototoxicity. These types of research open new opportunities to profound understanding of the nervous system mechanisms and its dysfunctions, and to identify potential drugs.

Choroby mózgu – wyzwaniem XXI wieku

Liczba osób zapadających na choroby mózgu znacząco wzrasta. Jednym z powodów jest wydłużenie się życia ludzi, co prowadzi do zwiększenia liczby osób z chorobą Alzheimera (AD) i Parkinsona (PD). Ponadto styl i tempo życia zwiększają liczbę przypadków urazów głowy (TBI), chorób psychicznych i innych

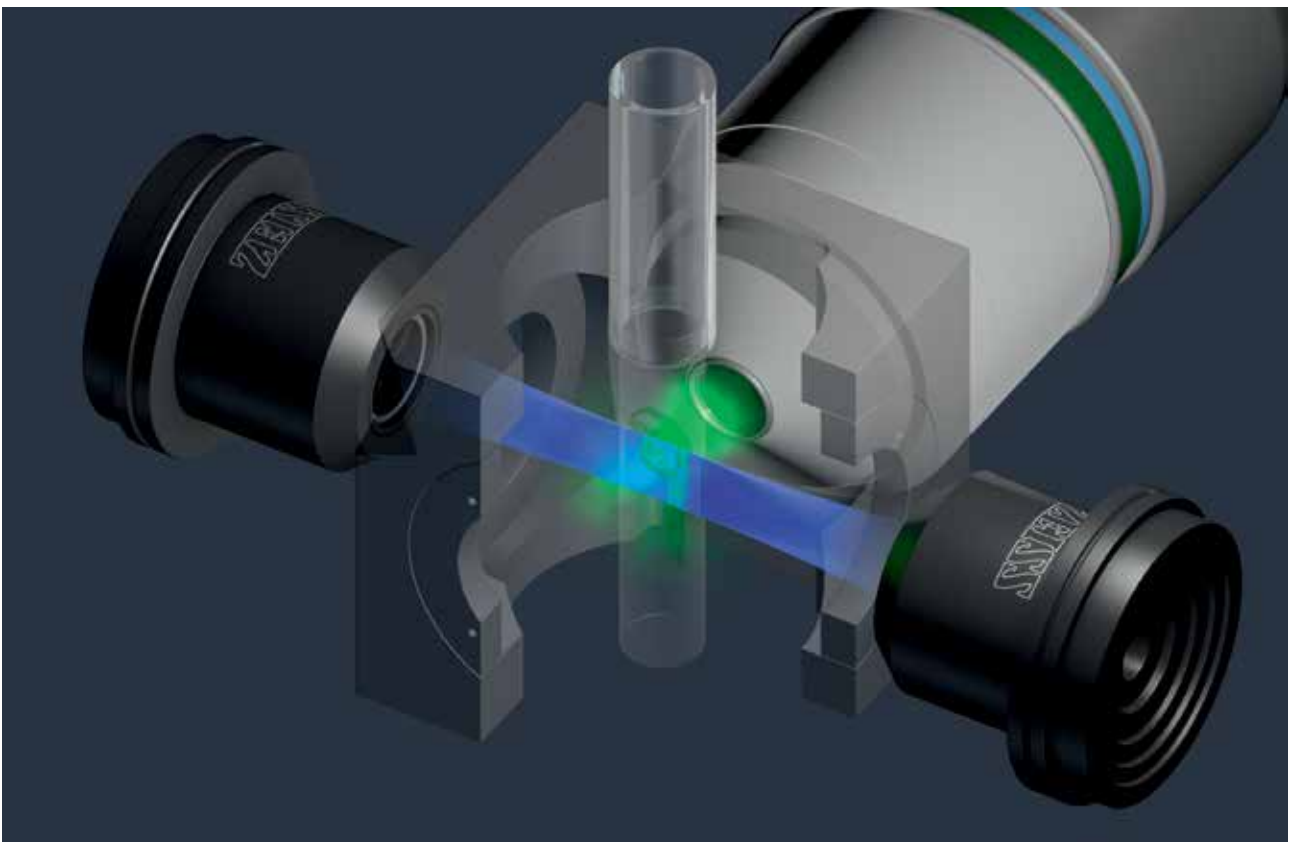
patologii mózgu. Zrozumienie ich mechanizmów jest kluczowe do znalezienia sposobu na zapobieganie lub przynajmniej opóźnianie pojawienia się AD i PD, zwalczanie skutków TBI i udarów oraz leczenia chorób psychicznych. Od kilkunastu lat zintensyfikowano badania mózgu, w szczególności sieci neuronalnych oraz molekularnych procesów zachodzących w układzie nerwowym. Stało się to możliwe

dzięki zaangażowaniu większych środków finansowych oraz rozwojowi nowych, wyrafinowanych technologii. W artykule opisujemy zastosowanie do badania mózgu nowoczesnych technik biologii molekularnej w połączeniu z ultranowoczesną mikroskopią.

Genetycznie kodowane sondy wapniowe, mikroskop SPIM i ryba danio pręgowany

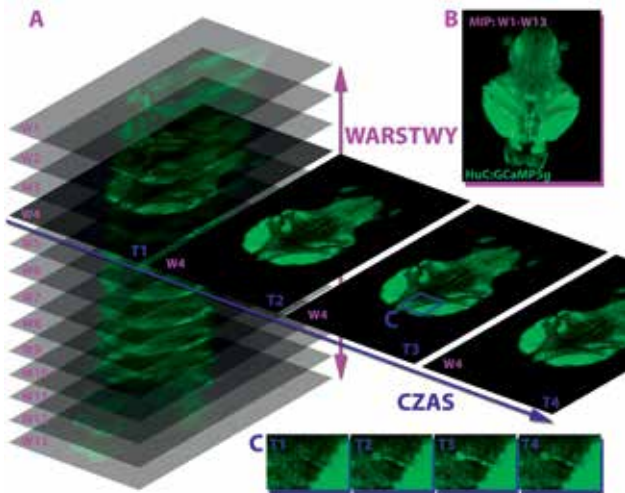
Jeszcze kilkanaście lat temu obserwacja *in vivo* sieci neuronów kręgowców, przesyłających impulsy nerwowe, była domeną filmów *science fiction*. Sytuacja zmieniła się radykalnie dzięki zastosowaniu dwóch zasadniczych osiągnięć. Po pierwsze stworzono genetycznie kodowane białkowe sondy fluorescencyjne, które zmieniają fluorescencję pod wpływem zmian poziomu jonów wapnia w komórce (ang. GECI – *genetically encoded calcium indicator*) lub zmian napięcia (ang. GEVI – *genetically encoded voltage indicator*), wskazując na aktywne komórki nerwowe [2, 13]. Reakcje te trwają ułamki sekundy, a do ich rejestracji niezbędny jest drugi wynalazek – mikroskop fluorescencyjny z możliwością sekcjonowania optycznego, czyli uzyskiwania obrazów fluorescencyjnych markerów tylko z wybranej płaszczyzny ogniskowania. Istnieje kilka metod

sekcjonowania optycznego: mikroskopia konfokalna, dwufotonowa, TIRF, a także przedmiot niniejszego artykułu – mikroskopia SPIM (ang. *single plane illumination microscopy*, jednopłaszczyznowa mikroskopia świetlna). Jedną z zalet mikroskopii SPIM jest czas ekspozycji porównywalny do pojedynczego impulsu nerwowego (około 1 ms–100 ms). Urządzenie tego typu jest w stanie zobrazować w ciągu kilku milisekund cały kadr, np. wybraną część mózgu, a nie tak, jak w przypadku mikroskopii konfokalnej czy dwufotonowej, poprzez czasochłonne skanowanie pojedynczych linii kadru [1, 6]. Przy obrazowaniu mózgu żywych organizmów niezbędne jest też ominięcie przez światło lasera fizycznej bariery, jaką tworzą kości czaszki. Niestety w przypadku gryzoni laboratoryjnych nie jest to możliwe bez naruszania struktury szkieletu. O wiele łatwiej jest natomiast zobrazować organy mniejszego i przezroczystego zwierzęcia, które rozwija się poza organizmem matki już od chwili zapłodnienia. Takim organizmem jest np. ryba danio pręgowany (łac. *Danio rerio*, ang. *zebrafish*). Przez pierwsze dni życia jej szkielet i skóra są wystarczająco cienkie i przezroczyste, aby mogły być łatwo penetrowane przez światło lasera o małej mocy. Wyniki uzyskane z takich badań mają znaczenie dla zrozumienia procesów zachodzących u ssaków,



Ryc. 1. Wiązka lasera (kolor niebieski) w kształcie prostokąta wzbudza jednocześnie cały obszar obiektu obrazowanego prostopadle. Ciemne cylindry to obiektywy wzbudzające, które skupiają światło lasera. Szary cylinder to obiektyw rejestrujący fluorescencję. Obraz wykorzystany za zgodą firmy Carl Zeiss Jena GmbH.

ponieważ danio wykazuje do nich duże podobieństwo genetyczne, np. posiada ponad 70% odpowiedników ludzkich genów.



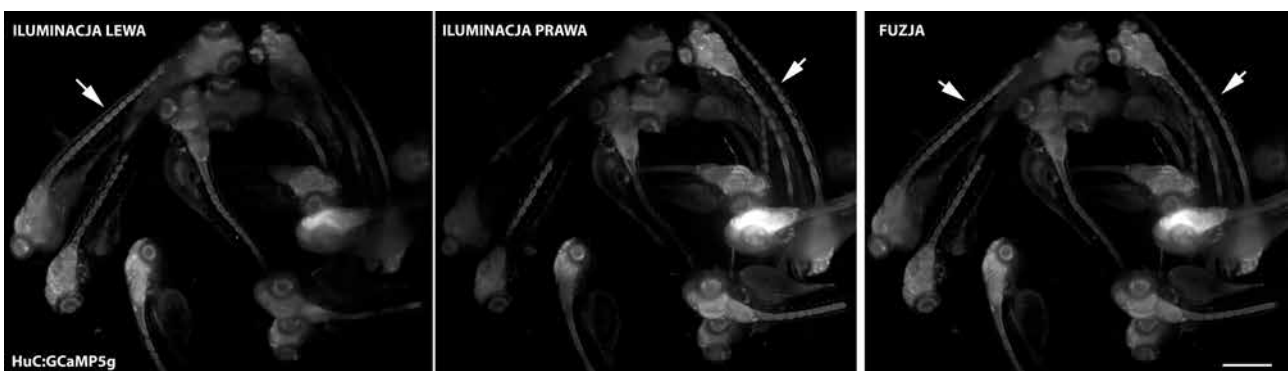
Ryc. 2. Grafika przedstawia sposób, w jaki zbierane są dane o aktywności mózgu ryby. Neurony ryby są wyznakowane sondą GCaMP5G, wrażliwą na zmiany poziomu wapnia. W części A pokazane są kolejne warstwy przekroju mózgu (od W1 do W13). Czas potrzebny na wykonanie zdjęcia takiej pojedynczej warstwy to około 10 ms. Mikroskop wykonuje te zdjęcia w kolejnych punktach czasowych (T1-T4), dzięki temu widzimy zmiany w czasie, w różnych częściach mózgu. Widok połączonych wszystkich warstw z jednego okresu czasowego w formie MIP (ang. maximum intensity projection) przedstawia część B. W części C powiększony został wycinek mózgu ze zdjęcia W4-T3, który pokazuje wzbudzenie pojedynczego neuronu.

Zasada działania mikroskopu SPIM

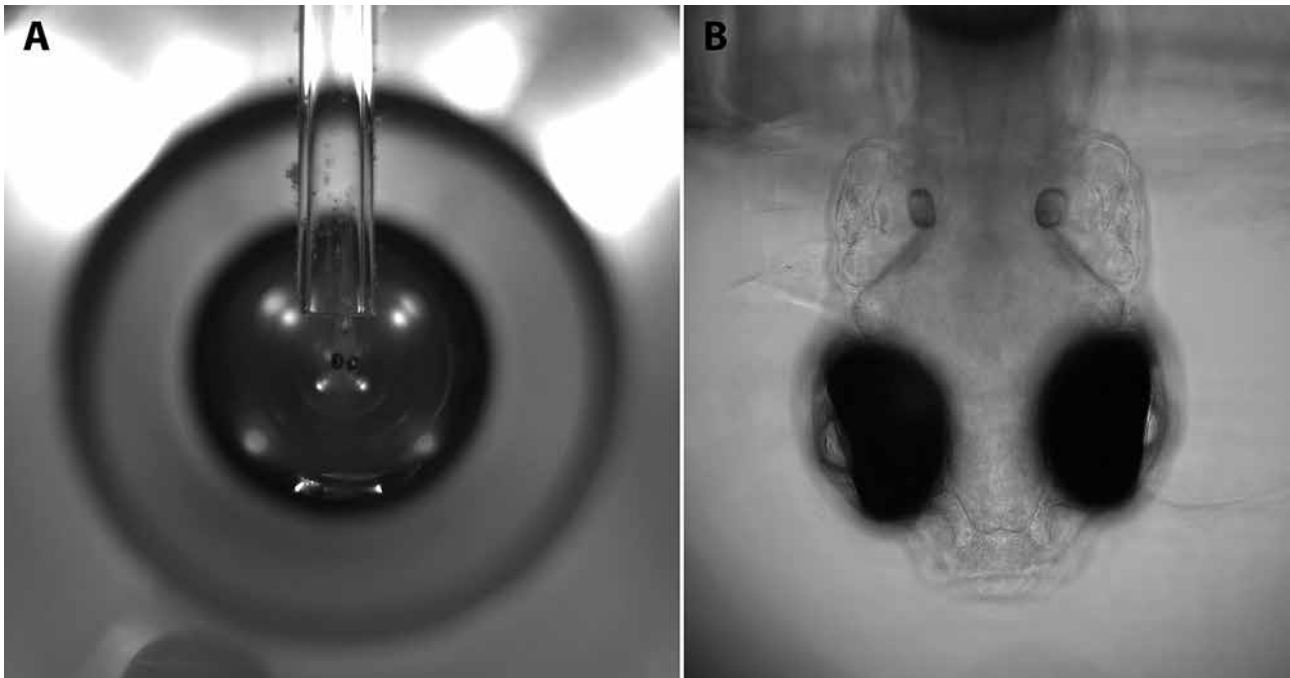
Najważniejszą ideą mikroskopii, do której zalicza się omawiany SPIM, zwaną mikroskopią *light sheet* (w wolnym tłumaczeniu – arkusz światła), jest sposób, w jaki światło lasera pada na analizowany materiał. Nazwa „arkusz światła” pochodzi od tego, że wiązka lasera rozpostarta jest na wybranej płaszczyźnie obrazowania. Płaszczyzna ta wzbudza

w jednym momencie cały wybrany kadr, a detekcja odbywa się prostopadle do wiązki lasera (Ryc. 1). Dzięki takiej konstrukcji unika się niepożądanego nasświetlenia obszarów spoza płaszczyzny detekcji, co umożliwia sekcjonowanie optyczne oraz radykalnie zmniejsza fototoksyczność i wyświecanie markerów fluorescencyjnych. Mikroskopia SPIM cechuje się też bardzo wysoką rozdzielczością czasową, a zastosowanie kilku linii laserów i dwóch kamer daje praktyczną możliwość jednoczesnego obrazowania różnych wyznakowanych typów tkanek lub komórek tego samego obiektu w jednym polu widzenia. Zaawansowane mechanizmy pozycjonowania badanego obiektu dają z kolei sposobność obrazowania przyległych regionów, kosztem nieznacznie wydłużonego odstępu pomiędzy kolejnymi punktami czasowymi. Dzięki temu otrzymuje się obraz struktury przestrzennej dynamicznie zmieniającej się w czasie (Ryc. 2). Dodatkowo, jeśli obiekt wymaga obrazowania dużej powierzchni, można użyć wiązki lasera padającej niezależnie z lewej i prawej strony. Powstałe dwa obrazy są później poddawane komputerowej fuzji, stając się wypadkową ich dwóch składowych (Ryc. 3).

W Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (MIBMiK) prowadzone są badania nad rybą danio przy użyciu mikroskopu Lightsheet Z.1 firmy Carl Zeiss Jena GmbH. Sprzęt ten pozwala na prowadzenie badań przyżyciowych na rybach lub innych organizmach, zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych, o rozmiarach nieprzekraczających jednego centymetra. Badany obiekt jest unieruchamiany w agarozie o niskim współczynniku topnienia, znajdującej się w mikropilarze i następnie zanurzany w komorze wypełnionej fizjologicznym roztworem (Ryc. 4). Niewielkie organizmy przeżywają w takim układzie nawet kilka dni, ponieważ tlen i inne substancje niezbędne do życia dyfundują przez ciekłą warstwę agarozy. W celu



Ryc. 3. Zdjęcie przedstawia kilkanaście 5-dniowych ryb wyznakowanych sondą GCaMP5G, która znajduje się w ich neuronach. Dzięki możliwości wzbudzenia materiału z dwóch stron (ILUMINACJA LEWA i PRAWA) otrzymujemy kompletny obraz (FUZJA), nawet jeśli poszczególne obiekty zasłaniają się wzajemnie. Strzałki wskazują na struktury, które są poprawnie obrazowane jedynie od strony, z której pada światło lasera. Linia skali na zdjęciu odpowiada 0,5 cm.



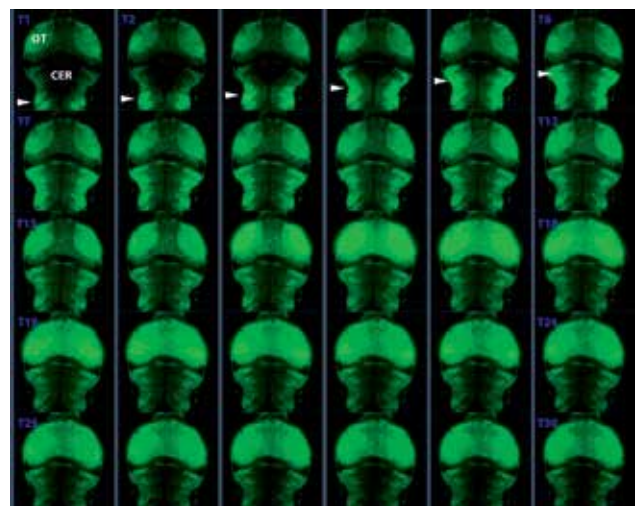
Ryc. 4. Część A przedstawia wnętrze komory mikroskopu widziane z kamery, która pozwala m.in. na sprawdzenie, czy próbka została poprawnie zamontowana. W centrum kadru znajdują się głowa 5-dniowej ryby, zamocowanej w szklanej mikrokapilarze, a w tle widoczna jest soczewka obiektywu obrazującego. Część B przedstawia powiększenie głowy ryby, widziane przez obiektyw obrazujący.

utrzymania takich samych parametrów doświadczeń, podczas ich trwania kontrolowana jest temperatura i poziom dwutlenku węgla w otoczeniu. Z kolei wykorzystanie laserów o niskiej mocy i wysoko czułych kamer sCMOS sprawia, że obrazowanie nie powoduje fototoksyczności i obiekt może być naświetlany wielokrotnie w ciągu jednego doświadczenia.

Zastosowanie mikroskopii SPIM w biologii

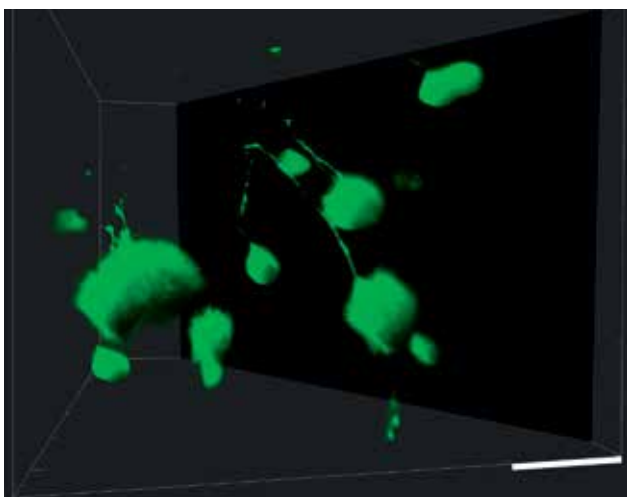
Opisane wcześniej możliwości pozwalają na przeprowadzenie całego wachlarza skomplikowanych eksperymentów *in vivo*. Dzięki zaawansowanym technologiom inżynierii genetycznej można w stosunkowo krótkim czasie stworzyć transgeniczną linię danio, która ma fluorescencyjnie wyznakowaną wybraną przez nas tkankę lub typ komórek. Takie linie danio pręgowanego są intensywnie wykorzystywane w badaniach embriologicznych do śledzenia zmian struktur i migracji komórek. W 2008 roku przy pomocy mikroskopii SPIM został pokazany 24-godzinny rozwój całego rybiego embrionu [7]. Szlaki, w jakich układały się komórki podczas kolejnych faz embriogenezy, zostały dokładnie prześledzone na podstawie trajektorii poszczególnych fluorescencyjnie wybarwionych jąder komórkowych. Rozwój ponad 55 milionów komórek został udostępniony jako film w serwisie YouTube [<https://www.youtube.com/watch?v=3xh441Wdv84>].

W Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK prowadzimy badania nad zmianami rozwojowymi spowodowanymi zaburzoną gospodarką wapniową w komórkach układu nerwowego, m. in. w modelu rodzinnej postaci choroby Parkinsona. Ten model *D. rerio* posiada nieaktywny gen *pink1* (*PTEN-induced putative kinase 1*). Powoduje to między innymi utratę około 20% neuronów dopaminergicznych (ND) [3]. Utrata części ND jest cechą charakterystyczną choroby Parkinsona u ludzi. Nasze ostatnie badania wyka-



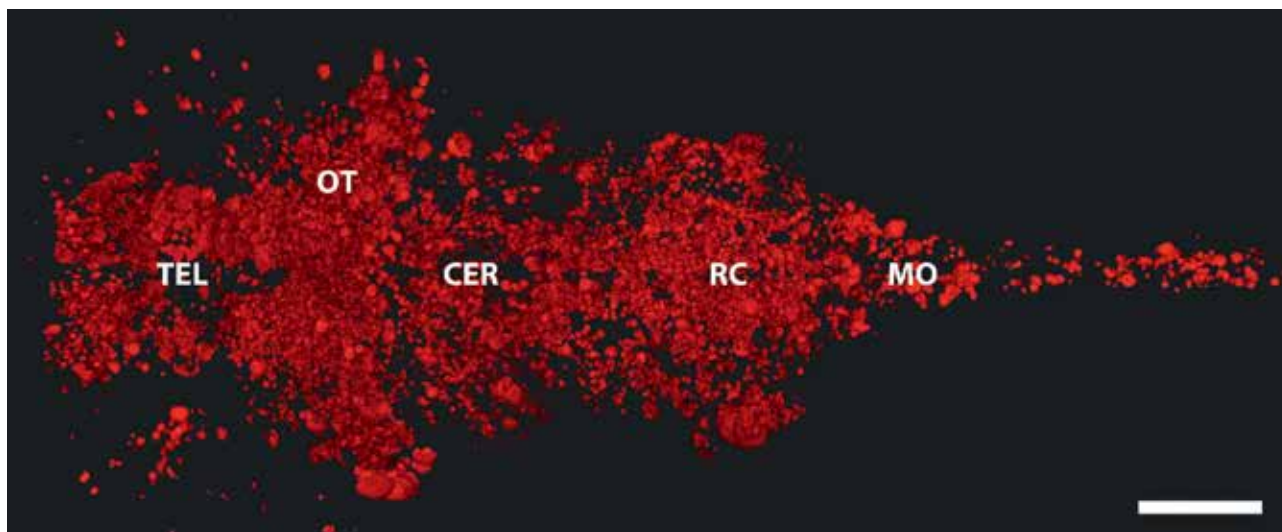
Ryc. 5. Kolejne zdjęcia (T1, T2...T30) przedstawiają falę wapniową rozchodzącą się w mózgu 5-dniowej ryby po indukcji kwasem glutaminowym. Różnica czasu pomiędzy nimi to 0,8 sekundy. Białe strzałki pokazują obszary, w których pojawia się wypływ wapnia do cytoplazmy, powodujący zwiększoną fluorescencję sondy GCaMP5G. OT – *optic tectum*; CER – *cerebellum*.

zały, że inaktywacja kanału wapniowego MCU (ang. *mitochondrial calcium uniporter*) niweluje zanik ND [12]. W związku z tym obecnie analizujemy stan mitochondriów i parametry homeostazy wapniowej w neuronach mutantów *pink1*. W celu zaobserwowania potencjalnych zmian w aktywności neuronów mierzonych na podstawie zmian poziomu jonów wapnia, skrzyżowaliśmy rybę *pink1*^{-/-} z linią posiadającą w neuronach sondę GCaMP5G [1], wrażliwą na zmiany poziomu jonów wapnia. Przy użyciu mikroskopii SPIM obserwujemy wzrost stężenia jonów wapnia w neuronach pod wpływem kwasu glutaminowego i porównujemy to zjawisko w linii dzikiej i w linii z mutacją w *pink1* (Ryc. 5).



Ryc. 6. Zdjęcie przedstawia neurony w tyłomózgowiu 3-dniowej ryby, w których występuje ekspresja białka fuzyjnego β -kateniny-GFP. Obiekty zostały przedstawione w formie cieniowanego renderowania 3D z rzutem perspektywicznym. Podziałka w prawym, dolnym rogu zdjęcia odpowiada 0,1 mm i zmienia się wraz z rzutem perspektywy.

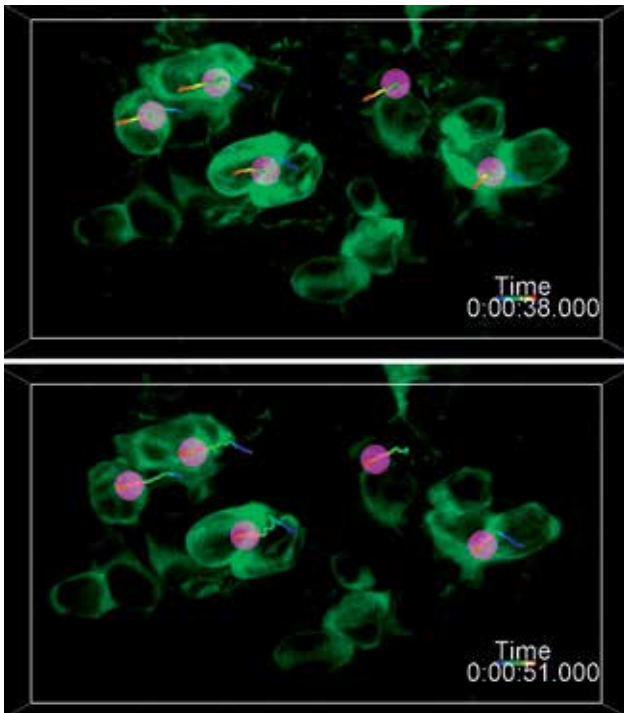
Mikroskopia SPIM może być również wykorzystywana do śledzenia zmian zachodzących w głównych szlakach sygnałowych żywych organizmów, co jest niezmiernie istotne w przypadku poszukiwań przyczyn powstawania chorób człowieka. Funkcjonowanie ścieżki sygnałowej Wnt [11] jest kluczowe podczas embriogenezy, różnicowania komórek i rozwoju tkanek organów, w tym mózgu ssaków [9]. Różne badania wskazują na powiązanie nieprawidłowości w działaniu tego szlaku z występowaniem ludzkich chorób nowotworowych [5] i zaburzeń psychicznych, w tym choroby afektywnej dwubiegunowej [14]. Przy użyciu stworzonych w Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK transgenicznych linii *D. rerio* będziemy analizować dystrybucję głównych białek szlaku Wnt, jakimi są β -katenina oraz związany z nią czynnik transkrypcyjny TCF7L2 (ang. *transcription factor 7-like 2*, czynnik transkrypcyjny limfocytów T). Jedna linia ryb wykazuje ekspresję białka fuzyjnego β -kateniny-GFP (ang. *green fluorescent protein*), a druga linia – ekspresję czynnika *tcf7l2* z czerwonym fluoroforem *mCherry*. Ta ekspresja jest komórkowo specyficzna, bo występuje w neuronach tych linii dzięki użyciu odpowiedniego promotora (promotor HuC). Na Ryc. 6 przedstawiono pojedyncze neurony 3-dniowej, transgenicznej larwy danio, zawierające wyznakowaną na zielono β -kateninę. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego *tcf7l2* w jądrach komórek układu nerwowego 5-dniowej ryby reprezentowana jest przez czerwoną fluorescencję pochodzącą od *mCherry* (Ryc. 7). W przyszłości linie te można będzie wykorzystać do badań zmian w neuronach, wynikających z dysfunkcji ścieżki Wnt.



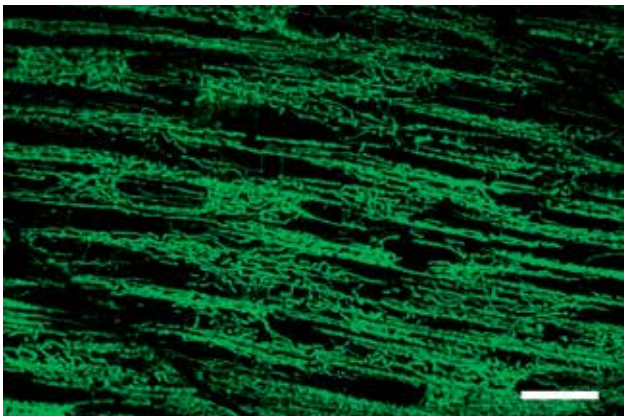
Ryc. 7. Zdjęcie przedstawia struktury w mózgu 5-dniowej larwy danio, w których zachodzi ekspresja jądrowego czynnika transkrypcyjnego *tcf7l2*. TEL – telencephalon; OT – optic tectum; CER – cerebellum; RC – rhombencephalon; MO – medulla oblongata. Podziałka w prawym, dolnym rogu zdjęcia odpowiada 0,1 mm.

Analiza danych mikroskopowych

Po wykonaniu obrazowania mikroskopowego kolejnym krokiem jest analiza otrzymanych danych. Format, w jakim je uzyskujemy, to zbiór obrazów przedstawiających fluorescencję o różnej intensywności. Oprócz wstępnej wizualnej oceny nie możemy na tym etapie wysnuć dodatkowych wniosków. Dlatego też obrazy te poddawane są analizie w progra-



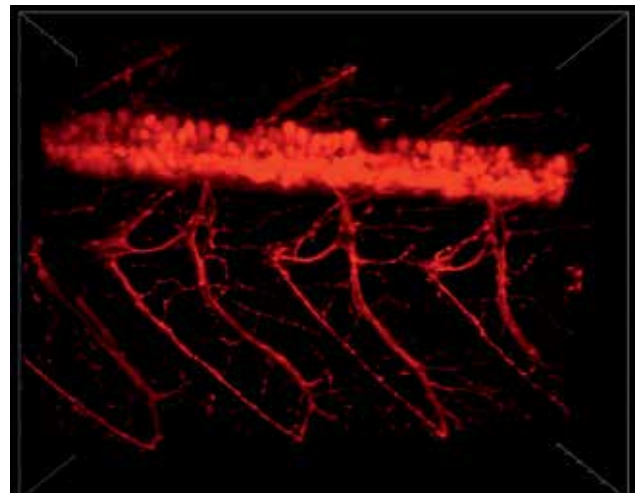
Ryc. 8. Podczas obrazowania obiektów *in vivo* częstym zjawiskiem jest ich dryf lub zmiana pozycji pod wpływem skurczów mięśni. Na poniższym przykładzie widać jaką drogę (tęczowa linia) przebyły w ciągu 13 sekund wyselekcjonowane neurony. Dzięki szybkości mikroskopu SPIM śledzony obszar obejmował około 40 warstw i neurony pozostały w kadrze pomimo przemieszczenia.



Ryc. 9. Zdjęcie przedstawia sieci mitochondrialne w mięśniach szkieletowych 5-dniowej ryby. Obszar obejmuje szerokość jednego segmentu ogona. Podziałka w prawym dolnym rogu zdjęcia odpowiada 10 μm .

mach takich jak ImageJ lub Bitplane Imaris. Dzięki odpowiednim algorytmom informacja, którą tworzy fluorescencja, jest zamieniana na wirtualne obiekty

3D, dla których można określić różne parametry. Uzyskujemy wtedy informacje o rozmiarach, objętości, powierzchni, kształtach (kuliste, elipsoidalne, rozgałęzione itp.), wzajemnym położeniu czy intensywności fluorescencji badanych struktur. Dodatkowo, po zidentyfikowaniu fluorescencyjnego obiektu, istnieje możliwość automatycznego śledzenia go w czasie i przestrzeni, co jest niezbędne np. w analizie skurczów mięśni czy monitorowaniu zachowania



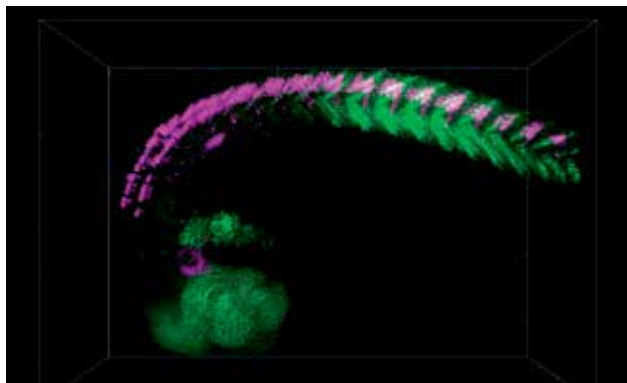
Ryc. 10. Zdjęcie przedstawia strukturę neuronów motorycznych w rejonie ogona 5-dniowej ryby. Charakterystyczne struktury w kształcie litery V wyznaczają granice pomiędzy kolejnymi segmentami ogona. Z gęsto upakowanych ciał neuronów w rdzeniu kręgowym odchodzą aksony zakończone płytkami nerwowo-mięśniowymi. Obraz został przedstawiony w formie MIP z rzutem perspektywnym.

makrofagów. Śledzenie neuronu przemieszczającego się pod wpływem skurczu mięśni, z jednoczesnym rejestrowaniem zmiany stężenia poziomu wapnia w cytoplazmie, przedstawia Ryc. 8. Tęczowa linia obrazuje drogę, którą pokonał monitorowany obiekt – wyznakowany neuron. Innymi przykładami wizualizacji są wybarwione neurony motoryczne w transgenicznej linii *Tg(mnx1:tRFP)* (Ryc. 9) oraz mitochondria w linii *Tg(Xla.Eef1a1:mlsEGFP)* (Ryc. 10) [8]. Linie transgeniczne można krzyżować, otrzymując kilka fluoroforów w jednym organizmie. Dwie powyższe linie zostały skrzyżowane, czego wynikiem jest linia, w której możemy jednocześnie obserwować fluorescencyjne neurony i mitochondria (Ryc. 11).

Prognozy rozwoju technologii mikroskopowych do badania mózgu

Technologia mikroskopii *light sheet* wciąż się rozwija i chociaż już można mówić o ogromnym ułatwieniu szybkiego obrazowania dużych obiektów, to wciąż należy udoskonalić kilka jej cech. Główną wadą podstawowych wersji tych mikroskopów jest rozdzielczość obrazu ustępująca najnowszym mikroskopom

konfokalnym. Jest to spowodowane tym, że obrazowanie próbki pod kątem prostym do padającego lasera pozostawia po „ciemnej stronie” obrazowanego obiektu artefakt wynikający z dyfrakcji. Jest on później korygowany



Ryc. 11. Larwa 24-godzinnej ryby z wyznakowanymi neuronami motorycznymi (magenta) i mitochondriami (zielony). Obraz został przedstawiony w formie MIP z rzutem perspektywicznym.

ny przez algorytmy komputerowe, ale tylko częściowo. Drugą wadą jest niewystarczająca możliwość penetracji gęstych i głęboko położonych struktur. Prowadzone są badania, by wyeliminować te wady poprzez sprzężenie

technologii mikroskopii *light sheet* z innymi typami mikroskopii o bardzo wysokiej rozdzielczości. Najbardziej obiecującą fuzją wydaje się być wykorzystanie technologii super-rozdzielczości, takich jak STED (ang. *stimulated emission depletion microscopy*), za którą w 2014 roku przyznano nagrodę Nobla w dziedzinie chemii [4]. Dzięki tym przełomowym odkryciom przekroczony został limit dyfrakcyjny. Technologia STED opiera się na selektywnej dezaktywacji fluoroforów poprzez zastosowanie dodatkowej wiązki lasera w formie pierścienia, która wygasza rozproszoną fluorescencję wokół obrazowanego punktu. Konstruowane są też coraz szybsze i bardziej czułe kamery, które pozwalają na jednoczesne śledzenie najkrótszych impulsów nerwowych z coraz większych obszarów mózgu. Możliwe będzie dzięki temu zbudowanie behawioralnych map interakcji pomiędzy neuronami w całym układzie nerwowym [10].

Pragniemy podziękować dr Tomaszowi Węgierskiemu za pomoc w redagowaniu niniejszego artykułu oraz całemu zespołowi Pracowni Hodowli Ryb Danio w MIBMiK za opiekę nad rybami wykorzystywanymi do badań.

Bibliografia

- Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ. (2013). Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Meth.* 10, 413–420.
- Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300.
- Flinn LJ, Keatinge M, Breaud S, et al. (2014). TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. *Ann Neurol.* 74, 837–847.
- Friedrich M, Gan Q, Ermolayev V, Harms GS. (2011). STED-SPIM: Stimulated Emission Depletion Improves Sheet Illumination Microscopy Resolution. *Biophys J.* 100, L43–L45.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1653, 1–24.
- Keller PJ, Schmidt AD, Santella A, et al. (2010). Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy. *Nat Meth.* 7, 637–642.
- Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EHK. (2008). Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science* 322, 1065.
- Kim MJ, Kang KH, Kim C-H, Choi S-Y. (2008). Real-time imaging of mitochondria in transgenic zebrafish expressing mitochondrially targeted GFP. *BioTechniques.* 45, 331–334.
- Kim W-Y, Snider WD. (2011). Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System. *Front Mol Neurosci.* 4, 44.
- Randlett O, Wee CL, Naumann EA, et al. (2015). Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. *Nat Meth.* 12, 1039–1046.
- Sharma RP, Chopra VL. (1976). Effect of the wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 48, 461–465.
- Soman S, Keatinge M, Moein M, DaCosta M, Mortiboys H, Skupin A, Sugunan S, Bazala M, Kuznicki J, Bandmann O. (2016). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter (MCU) rescues dopaminergic neurons in *pink1*^{-/-}-zebrafish. *Eur J Neurosci*, Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/ejn.13473.
- St-Pierre F, Marshall JD, Yang Y, Gong Y, Schnitzer MJ, Lin MZ. (2014). High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nat Neurosci.* 17, 884–889.
- Valvezan AJ, Klein PS. (2012). GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder. *Front Mol Neurosci.* 5, 1.