

Nanoszkópiás képalkotási eljárások alkalmazása az
idegrendszer molekuláris plaszticitásának
vizsgálatában



Csapóné Miczán Vivien

A PhD disszertáció tézisei

Témavezetők:
Prof. Katona István
Dr. Horváth András

PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM
INFORMÁCIÓS TECHNOLÓGIAI ÉS BIONIKAI KAR
ROSKA TAMÁS MŰSZAKI ÉS
TERMÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Budapest, 2020.

1 Kivonat

Az agy működésének megértése, sejteinek bonyolult kapcsolatrendszere, diverzitása, a szinapszisok sokfélesége és változékonysága, és az ezen funkciók mögött meghúzódó fehérjék változatossága miatt egy hihetetlenül kockázatos vállalkozásnak ígérkezik. Azonban korunkban egyre több és több új, hatékony módszer áll rendelkezésünkre, hogy vizsgálni tudjuk ezt a rendkívüli komplexitást. Csoportunkban korábbi munkánk során kifejlesztettünk egy olyan mikroszkópiás módszert, mellyel egyszerre vagyunk képesek egyedi sejtípusok, sejtek, sejtstrucetkék jelölésére, és azokon belül tudjuk vizsgálni egy-egy kiválasztott fehérje mennyiségét, nanoskálájú elhelyezkedését. Az így megvalósított korrelált konfokális és szuper-rezolúciós mikroszkópia tehát arra ad eszközt a kezünkbe, hogy ezen molekuláris adatok alapján következtethessünk a vizsgált fehérjék sejten belül betöltött szerepére. Dolgozatomban két olyan tudományos kutatást mutatok be, ahol kihasználtuk ennek a korrelált módszernek az előnyeit.

Az első munkában az egér hippocampusz, a bazolaterális amygdala és a szomatoszenzoros kéreg területén található, a kannabinoid receptor 1-es típusát (CB₁) kifejező gátló idegsejt osztály karakterisztikus kalciumkötő fehérjéit kerestük. Abban bízunk, hogy hasonlóan a többi interneuron típushoz ezzel egy széles körben használható markerre teszünk szert, valamint ezen fehérjék ismeretével közelebb kerülhetünk annak a megértéséhez, hogy hogyan alakulnak ki a CB₁-es interneuronok különleges

élettani tulajdonságai, mely alapján betöltik nélkülözhetetlen hálózati szerepüket. Egy számítógépes egysejt-mRNS szekvenálási adatbázisból indultunk ki, és azt találtuk, hogy az N-terminális EF-kéz kalciumkötő fehérje 1-es és 2-es típusa (NECAB1 és NECAB2) jó jelöltek lehetnek a további kutatásokhoz. A továbbiakban az adatbázis alapján nyert információkat kísérletesen is megerősítettük, először mRNS-szinten, majd fehérje szinten populációs és egyedi sejttes vizsgálatokkal. Ezután pedig nanoskálájú méréseket végeztünk korrelált konfokális és szuper-rezolúciós mikroszkópia segítségével, melynek során kimutattuk a két fehérje mennyiségi és eloszlásbeli különbségeit az idegsejtek különböző részeiben.

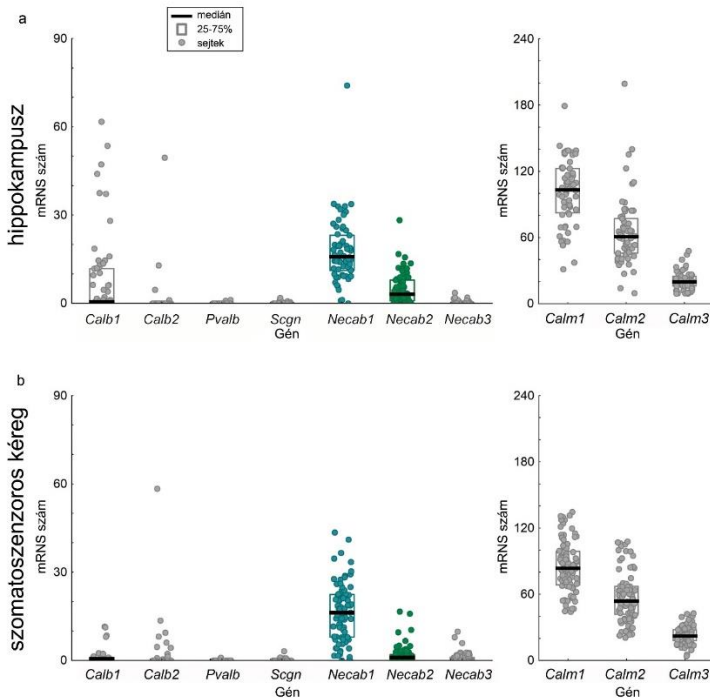
A második kutatási témában Δ^9 -tetrahydrokannabinollal (THC) kezelt patkány anyák utódjaiban vizsgáltuk a vegyület hatását a dopaminerg jutalmazó rendszerre. Megmutattuk, hogy a ventrális tegmentális területen (VTA) a kezelés nem okoz a dopaminerg sejtek számában eltérést, és a CB₁ receptorok száma sem változik, azonban a dopaminerg sejtek bemenetein szinapszis-specifikus átrendeződés történik. Megváltozik a serkentő szinapszisok száma és erőssége, valamint a gátló szinapszisok erőssége is, melyet szintén a korrelált mikroszkópiával mutattunk meg. Ezután kollaborátoraink közreműködésével feltártuk ennek elektrofiziológiai és viselkedésbeli okait és következményeit, majd egy lehetséges kezelési módszert is teszteltünk a változások kivédésére.

2 Új tudományos eredmények

Tézis 1a: *In silico* egysejt mRNS-szekvenálási adatbázisok vizsgálata alapján azt találtam, hogy az egér hippocampusz CA1 és CA2/CA3 régiójának, valamint a szomatoszenzoros kéregnek a CB₁+ interneuronjai expresszálják a NECAB1 és NECAB2 kalciumkötő fehérjék mRNS-eit. Ezt megerősítettem kísérletes eredményekkel populációs szinten mRNS és fehérje szinten is a hippocampuszban, szomatoszenzoros kéregben és a bazolaterális amygdalában.

Kapcsolódó publikációk: [J4], [C8], [C9]

Régóta érdekli az interneuron-kutatókat, hogy vajon melyek lehetnek a CB₁+ interneuronoknak a konszenzus kalciumkötő fehérjéi, amelyek jó populációs markerként szolgálhatnak, és akár felelősek lehetnek a sejtcsoport specifikus tüzelésmintázatáért és az agyi hálózatokban betöltött szerepéért. Az egysejt mRNS szekvenálás technikájának fejlődésével lehetőségünk nyílt arra, hogy egy átfogó hippocampális és szomatoszenzoros kéregbeli adatbázisban ezen lehetséges kalciumkötő fehérjék után kutassunk. Elemzéseink után a NECAB1 és NECAB2 fehérjét emeltük ki, mint jelölteket, és a továbbiakban kísérletes munkával bizonyítottuk az adatbázis alapján felállított hipotézisünket. Ez egy jó példa arra, hogyan lehet felhasználni a napjainkban egyre nagyobb mennyiségben termelődő adatot egy-egy kérdés megválaszolására, majd kísérletekkel validálni azt.



1. ábra A hippocampális és kortikális CB_1+ interneuronok kifejezik a *Necab1* és *Necab2* mRNS-eket *in silico* adatok alapján (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)

a, b) Zeisel és munkatársai [1] egyedi sejt mRNS szekvenálási adatbázisának *in silico* elemzése alapján a CB_1+ interneuronok kalciumkötő fehérje expressziós profilja.

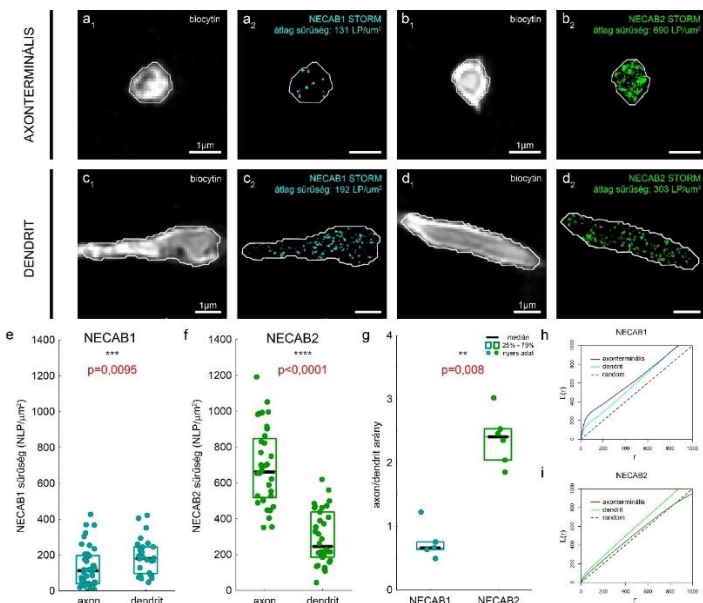
A klasszikus kalciumkötő fehérjék (calbindin – *Calb1*, calretinin – *Calb2*, parvalbumin – *Pvalb* és secretagoin – *Scgn*) alacsony szinten, és csak a CB_1+ interneuronok bizonyos alcsoportjaiban expresszálódnak, de a *Necab1* és *Necab2* mRNS-ek majdnem mindegyik CB_1+ sejtben kimutathatóak a) a hippocampusban (n=61 sejt) b) a szomatosenzoros kéregben (n=84 sejt).

A kalmodulin kalciumkötő fehérjék mRNS-ei jelen vannak a CB_1+ interneuronokban is a) a hippocampusban, b) a szomatosenzoros kéregben, és pozitív kontrollként szolgálnak a módszer validálásához.

Tézis 1b: Egyedileg azonosított sejteken korrelált konfokális és STORM szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével megmutattam, hogy a NECAB1 és NECAB2 fehérjék szubcelluláris eloszlása különbözik az egér hippocampusz CA1 régiójában: a NECAB1 fehérje nagyobb sűrűségben fordul elő a szomatodendritikus kompartmentben, míg a NECAB2 fehérje inkább az axon terminálisokban sűrűsödik be.

Kapcsolódó publikációk: [J4], [C8], [C9]

A NECAB1 és NECAB2 fehérjék között nagy a szekvenciabeli hasonlóság, és felmerült a kérdés, miért van szüksége ugyanazon sejtípusnak két ilyen hasonló proteinre. Egyedi sejt kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy van-e valamilyen elhelyezkedésbeli különbség a kétféle fehérje között. Míg konfokális mikroszkópiával a NECAB1-et nem sikerült detektálnunk az axonterminálisokban, viszont a NECAB2 itt fordult elő nagyobb mennyiségben, addig a korrelált konfokális és STORM kísérletekben megmutatkozott a szuper-rezolúciós módszer előnye, hiszen a magasabb szenzitivitásának köszönhetően az axonterminálisokban is detektálni tudtuk a NECAB1-et, viszont sokkal kisebb sűrűségben, mint a NECAB2-t. Ez a sűrűségbeli eltérés jelenthet funkcióbeli különbségeket is a két protein között.



2. ábra A NECAB1 és a NECAB2 fehérjék szubcelluláris sűrűségkülönbsége CB1+ hippokampális kosárs sejtekben (ábra: Miczán és mtsai., módosítva)

a₁, b₁, c₁, d₁) Biocytinnel töltött (fehér), morfológiailag karakterizált kosársajt (a₁, b₁ – axonterminális kompartment, c₁, d₁ – dendritikus kompartment). Aktív kontúr algoritmus [2] segítségével kijelölt ROI-k (fehér vonal).

a₂, c₂) Különböző sűrűségű NECAB1 STORM jel axon terminálisban és dendritben. A STORM koordinátákat szűrtük a ROI alapján.

b₂, d₂) Különböző sűrűségű NECAB2 STORM jel axon terminálisban és dendritben. A STORM koordinátákat szűrtük a ROI alapján.

e) A NECAB1 lokalizációs pontok sűrűsége magasabb a dendritekben az axon terminálisokhoz képest (N=6 és 5 állat, 43 és 28 ROI, Mann–Whitney U-teszt, p=0,0095).

f) A NECAB2 lokalizációs pontok sűrűsége magasabb az axonterminálisokban, mint a dendritekben (N=6 és 6 állat, 36 és 34 ROI, Mann–Whitney U-teszt, p<0,0001).

g) Az axonális és dendritikus STORM lokalizációs pontok aránya eltér a NECAB1 és a NECAB2 esetében. A NECAB1 a dendritikus kompartmentben, míg a NECAB2 az axonterminálisokban van jelen nagyobb sűrűségben (N=5 és 6 állat, Mann–Whitney U-teszt, p=0,008).

h) A Ripley L-függvény vizualizációja NECAB1+ dendritekre (cián) és axon terminálisokra (kék), mely azt mutatja, hogy a NECAB1 festés klaszterezettebb az axonterminálisokban, mint a dendritekben (N=6 és 5 állat, n=51 és 40 ROI). A fekete szaggatott vonalak a Poisson-eloszlást mutatják (random).

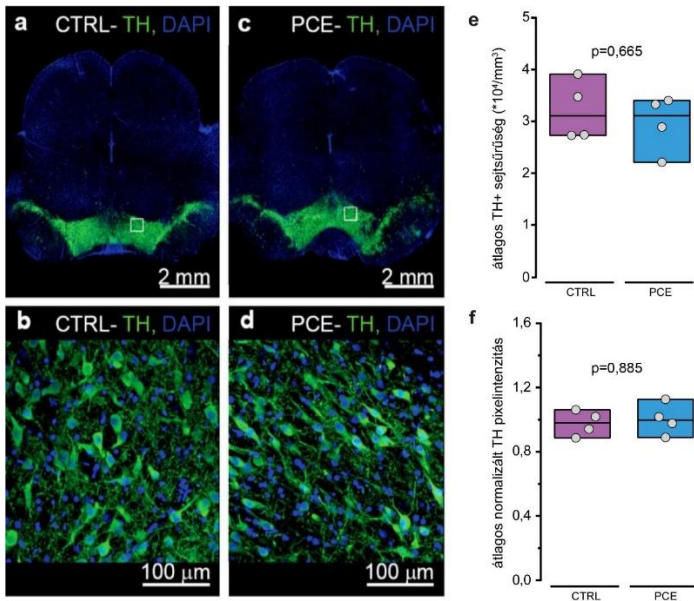
i) A Ripley L-függvény vizualizációja NECAB2+ dendritekre (világos zöld) és axon terminálisokra (sötét zöld), mely azt mutatja, hogy a NECAB2 festés klaszterezettebb a dendritekben, mint az axonterminálisokban (N=6 és 6 állat, n=31 és 37 ROI). A fekete szaggatott vonalak a Poisson-eloszlást mutatják (random).

Tézis 2a: Konfokális, valamint korrelált konfokális és STORM mikroszkópiás vizsgálatok segítségével azt találtam, hogy hím patkányokban prenatális kannabisz kezelés hatására nincs különbség a VTA dopaminerg sejtjeinek számában és az azok vGluT1+ és VIAAT+ bemenetein található CB₁ receptorok mennyiségében.

Kapcsolódó publikáció: [J3]

A kannabisz egyre nagyobb mértékű rekreációs célú és orvosi alkalmazásának növekedésével párhuzamosan növekszik világszerte a kannabisz használó várandós nők száma, akik sokszor nincsenek tisztában azzal, hogy árthatnak is magzatuknak. Fontos tehát vizsgálni az utódokban bekövetkező, a kannabisz aktív hatóanyagai, például a THC-okoza változásokat. Kutatásunkban a jutalmazó rendszerre fókuszáltunk, hiszen a drogok nagy része itt fejti ki hatását. Egy patkány állatmodellt használtunk, melyben az anyáknak adagoltunk THC-t a gesztációs időszak alatt. Bár a THC köztudottan hat a CB₁ receptorokon, amelyek a magzati élet során aktívan befolyásolják az agyfejlődést, nem találtunk különbséget a kezelt és kezeletlen patkányok ventrális tegmentális területén a

dopamint tartalmazó sejtek számában, illetve az azokra érkező serkentő (vGluT1+) és gátló (VIAAT+) bemeneteken a CB₁ receptorok számában. A kísérletek során kihasználtuk a korrelált konfokális és STORM mikroszkópia előnyeit, hiszen a CB₁ receptorok kis száma miatt konvencionális mikroszkópiával nem lett volna lehetséges a vizsgálat, szükség volt a STORM nagyobb érzékenységére, valamint, hogy azonosítani tudjuk a bemeneteket konfokális mikroszkópia segítségével.



3. ábra A prenatális kannabisz kezelés nem változtatja meg a dopaminerg sejtek számát a VTA-ban (Frau, Miczán és mtsai., módosítva)

a) Anti-TH immunfestés (zöld) konfokális képe kontroll kezelésen átesett patkány agymetszeten. A sejtmagok DAPI festéssel vannak jelölve (kék).

b) Az a) panelen lévő fehér négyzettel jelölt terület kinagyítva.

c) Anti-TH immunfestés konfokális képe PCE kezelésen átesett patkány agymetszeten.

d) A c) panelen lévő fehér négyzettel jelölt régió kinagyítva.

n=12 képet készítettünk állatonként, a paneleken reprezentatív képek láthatóak.

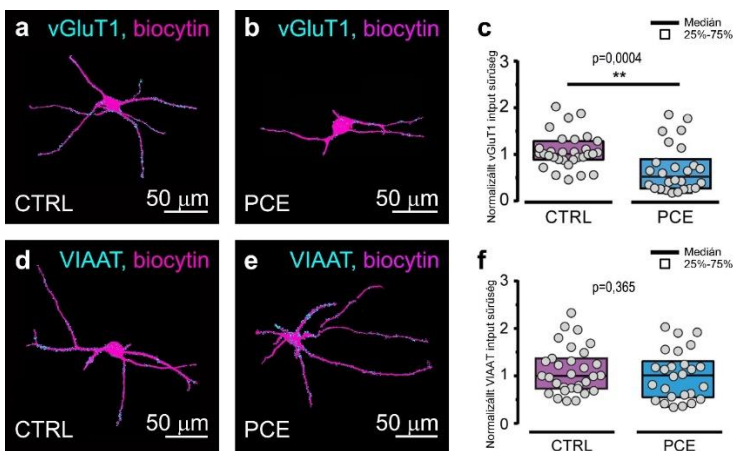
e) Az átlagos TH+ sejtsűrűség a VTA kijelölt területén nem tér el a kezelési csoportok között (N=4 és 4 állat, p=0,665, Mann-Whitney U-teszt).

f) Az átlagos TH pixelintenzitás a VTA kijelölt területén nem tér el a kezelési csoportok között (N=4 és 4 állat, p=0,885, Mann-Whitney U-teszt).

Tézis 2b: Konfokális, valamint korrelált konfokális és STORM mikroszkópiás vizsgálatok segítségével azt találtam, hogy a prenatális kannabisz kezelés komplex szinaptikus változásokat okoz a hím patkányok VTA-beli dopaminerg sejtjeinek serkentő és gátló bemeneteinek anatómiájában: kevesebb, ám serkenthetőbb vGluT1+ szinapszis lesz, a VIAAT+ szinapszisok gyengülnek, viszont számuk nem változik.

Kapcsolódó publikáció: [J3]

Egyedileg töltött VTA-beli dopaminerg sejteken többszörös fluoreszcens immunfestést végeztünk a vGluT1 serkentő és a VIAAT gátló szinaptikus markerek ellen, és nagyfelbontású konfokális képalkotás és komplex képfeldolgozási lépések után azt találtuk, hogy a dopaminerg sejtek bemeneteinek száma eltérő módon változik prenatális kannabisz kezelés hatására. A szinapszisok molekuláris elrendeződése is változik, ebben az esetben a korrelált mikroszkópia előnyeit ott tudtuk kihasználni, hogy szinapszis-specifikusan vizsgáltuk a bassoon állványfehérje besűrűsödését: míg a kezelt állatokban a serkentő szinapszisokban csökkent az állványfehérje sűrűsége, a gátlókban nőtt. Ez arra utal, hogy a serkentő szinapszisok erőssége nő, a gátlóké csökken, hiszen a szinaptikus fehérjesűrűség befolyásolja a feszültségfüggő kalciumcsatornák számát az aktív zónában. Ezen kívül a változatlan számú CB₁ receptornak eltérő mennyiségű kalciumcsatornát kell szabályoznia, ami szintén hozzájárulhat a változásokhoz. Az anatómiai megfigyeléseinket kollaborátoraink elektrofiziológiai mérésekkel támasztották alá, és viselkedésszerű fenotípus különbséget is találtak a kezelt és kezeletlen állatok között. Továbbá sikerült egy, már korábban más indikációra forgalomba került szerrel meggátolni a változásokat a kezelt állatokban, ami ígéretes gyógymódot jelenthet a jövőben azon gyermekek számára, akik *in utero* találtak a kannabisz hatóanyagaival.



4. ábra A PCE-kezelés hatására csökken a dopaminerg sejtekre érkező serkentő bemenetek száma, míg a gátló inputok sűrűsége nem változik (Frau, Miczán és mtsai., módosítva)

Töltött VTA-beli dopaminerg sejtek 3D rekonstrukciója (magenta) a, d) kontroll, b, e) PCE-kezelt állatokból, a, b) vGluT1+ d, e) VIAAT+ szinaptikus bemenetek (cián) feltüntetésével.

c) A vGluT1+ bemenetek sűrűségének számszerűsítése a biocytin objektumok felszínére normalizálva ($p=0,0004$, Mann-Whitney U-teszt $n=31$ és 26 kép alapján).

f) A VIAAT+ bemenetek sűrűségének számszerűsítése, a biocytin objektumok felszínére normalizálva ($p=0,365$, Mann-Whitney U-teszt $n=31$ és 26 kép alapján).

3 A szerző publikációi

[J1] L. Barna*, B. Dudok*, **V. Miczán**, A. Horváth, Z. I. László, and I. Katona, “Correlated confocal and super-resolution imaging by VividSTORM,” *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 1, pp. 163–183, 2016.

[J2] Barna L., Dudok B., **Miczán V.**, Horváth A., Katona I., „3. Fényszimpózium. A CB₁ kannabinoid receptor sejtípus-specifikus eloszlásának vizsgálata VividSTORM segítségével”, *Magyar Tudomány*, vol. 177, no. 1 pp. 35-38., 2016.

[J3] R. Frau*, **V. Miczán***, F. Traccis, S. Aroni, C. I. Pongor, P. Saba, V. Serra, C. Sgheddu, S. Fanni, M. Congiu, P. Devoto, J. F. Cheer, I. Katona* and M. Melis*, „Prenatal THC exposure produces a hyperdopaminergic phenotype rescued by pregenolone”, *Nat. Neurosci.*, vol. 22 no. 12, pp. 1975-1985, 2019.

[J4] **V. Miczán**, K. Kelemen, J. R. Glavinics, Z. I. László, B. Barti, K. Kenesei, M. Kisfali, I. Katona, „NECAB1 and NECAB2 are consensus calcium-binding proteins of the CB₁ -positive interneuron population in the mouse forebrain”, *Cerebral Cortex*, vol., no., pp. 2021. elfogadva

[J5] Z. I. László*, Z. Lele*, M. Zöldi, **V. Miczán**, F. Mógor, G. M. Simon, K. Mackie, I. Kacs Kovics, B. F. Cravatt, and I. Katona, “ABHD4-dependent developmental anoikis safeguards the embryonic brain,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 2020.

[C1] **V. Miczán**, „Investigation of the subcellular distribution of CB₁ cannabinoid receptors with correlated confocal and superresolution STORM microscopy” *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* 10 pp. 85-88. (2015)

[C2] **V. Miczán**, „VividSTORM: a new software for the correlated visualization and analysis of pixel intensity-based and localization microscopy data”, *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* 11 pp. 75-78. (2016)

[C3] **V. Miczán**, „Novel analysis tools for correlated confocal and super-resolution microscopy”, *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* 12: pp. 28-28., (2017)

[C4] **V. Miczán**, B. Dudok, L. Barna, A. Horváth, I. Katona, „Probing identified synapses at the nanoscale: developing software tools for visualization and analysis of correlated confocal- and STORM super-resolution microscopy” *International Brain Research Organization Workshop (IBRO)*, 16-17 January, 2014, Debrecen (poszter)

[C5] **V. Miczán**, B. Dudok, L. Barna, A. Horváth, I. Katona, „VividSTORM: a new software for the correlated visualization and analysis of pixel intensity-based and localization microscopy data” *Frontiers in Neurophotonics Symposium (FINS)*, 3-6 October, 2015, Quebec City (poszter)

[C6] **V. Miczán**, L. Barna, B. Dudok, A. Horváth, J. R. Glavinics, Z. I. László, I. Katona, „VividSTORM: a novel open-source software for super-resolution and confocal microscopy images” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 12-16 November, 2016, San Diego (poszter)

[C7] **V. Miczán**, J. R. Glavinics, A. Horváth, L. Barna, B. Dudok, Z. I. László, I. Katona, „New features in VividSTORM promote correlated super-resolution and confocal microscopy” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23. September 2017, Pécs (poszter)

[C8] **V. Miczán**, K. Kelemen, J. R. Glavinics, Z. I. László, I. Katona, „Calcium-binding protein profile of CB₁ cannabinoid receptor-positive interneurons in the hippocampus, neocortex and basolateral amygdala”, *EMBO Workshop Cortical interneurons in health and disease*, 17 – 20 June 2018, Costa d’En Blanes (poszter)

[C9] **V. Miczán**, K. Kelemen, J. R. Glavinics, Z. I. László, B. Barti, K. Kenesei, M. Kisfali, I. Katona, „NECAB1 and NECAB2 are consensus calcium binding proteins of the CB₁ -positive interneuron population in the mouse forebrain” *Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference (GRC)* 21-26 July 2019, Castelldefells (poszter)

[C10] B. Barti, B. Dudok, K. Kenesei, **V. Miczán**, M. Ledri, I. Katona „Presynaptic nanoscale receptor/effector ratio controls neurotransmitter release probability at hippocampal GABAergic synapses” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23 September 2017, Pécs (poszter)

[C11] B. Barti, B. Dudok, K. Kenesei, **V. Miczán**, M. Ledri, G. Y. Balla, I. Soltész, I. Katona „The intra/perisynaptic CB₁ cannabinoid receptor pool tonically controls GABA release at mouse hippocampal synapses” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 3-7 November, 2018, San Diego (poszter)

[C12] B. Barti, B. Dudok, **V. Miczán**, K. Kenesei, G. Y. Balla, M. Ledri, D. Zala, Z. Lenkei, I. Soltész, I. Katona „Molecular stoichiometry of CB₁ receptors and the release machinery predicts tonic cannabinoid control of GABA release” *Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference (GRC)* 21-26 July 2019, Castelldefells (poszter)

[C13] J. R. Glavinics, **V. Miczán**, B. Dudok, Z. I. László, I. Katona “Nanoscale Bayesian clustering-based characterization of the presynaptic molecular architecture at GABAergic synapses” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23. September 2017, Pécs (poszter)

[C14] J. R. Glavinics, **V. Miczán**, K. Kelemen, Z. I. László, I. Katona “NECAB1 and NECAB2 are the two major calcium-binding proteins of the CB1 cannabinoid receptor-positive GABAergic interneuron population in the neocortex, hippocampus and the basolateral amygdala” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 3-7 November, 2018, San Diego (poszter)

[C15] K. Kenesei, M. Ledri, B. Tóth, B. Dudok, B. Barti, **V. Miczán**, G. Horvai, I. Katona „Differential contribution of diacylglycerol lipase-alpha to phasic and tonic endocannabinoid signaling at hippocampal GABAergic synapses” *Society for Neuroscience (SFN) Meeting*, 12-16 November, 2016, San Diego (poszter)

[C16] K. Kenesei, M. Ledri, B. Barti, B. Tóth, B. Dudok, **V. Miczán**, G. Horvai, J. Szabadics, I. Katona „Persistent cannabinoid control of GABA release does not require diacylglycerol lipase-alpha, the synaptic endocannabinoid-synthesizing enzyme” *Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting*, 20-23. September 2017, Pécs (poszter)

[C17] K. Kenesei, B. Barti, M. Ledri, M. Kisfali, B. Tóth, **V. Miczán**, J. R. Glavinics, K. Kelemen, G. Horvai, I. Katona „Differential contribution of diacylglycerol lipase-alpha to phasic and tonic endocannabinoid signaling” *Cannabinoid Function in the CNS Gordon Research Conference (GRC)* 21-26 July 2019, Castelldefells (poszter)

4 Irodalomjegyzék

- [1] A. Zeisel, A. B. Moz-Manchado, S. Codeluppi, P. Lönnerberg, G. La Manno, A. Juréus, S. Marques, H. Munguba, L. He, C. Betsholtz, C. Rolny, G. Castelo-Branco, J. Hjerling-Leffler, and S. Linnarsson, “Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq,” *Science (80-.)*, vol. 347, no. 6226, pp. 1138–1142, 2015.
- [2] P. Marquez-Neila, L. Baumela, and L. Alvarez, “A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 36, no. 1, pp. 2–17, 2014.