

DISS. ETH NO. 22947

TOWARDS LARGE-SCALE NEURAL CIRCUIT MAPPING
AND ANALYSIS USING ELECTRON MICROSCOPY

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

STEPHAN URS GERHARD

MSc in Neural Systems and Computation, ETH Zurich

born on 02.05.1984

citizen of Zurich, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Richard Hahnloser, examiner

Dr. Albert Cardona, co-examiner

Prof. Dr. Kevan Martin, co-examiner

Dr. Matthew Cook, co-examiner

2015

ABSTRACT

One of the great scientific challenges of our time is the reverse-engineering of the algorithmic principles operating in nervous systems. Progress in our understanding of these principles requires the elucidation of the structure of neural circuits. The structure of neural circuits can be obtained by mapping the morphology of neurons and annotating their synaptic connections using electron microscopy (EM) methods. Large EM image volumes of neural tissue can be generated routinely at nanometer resolution with automated acquisition methods. However, the size of these volumes and the complexity of neuronal arbors renders the extraction and analysis of neural circuits slow and tedious. This represents a major bottleneck for the analysis of neural circuits.

To tackle this bottleneck, we developed a web-based open-source software for the mapping, analysis, and visualization of neural circuits (www.catmaid.org). This software enables fast, accurate, and collaborative mapping of neural circuits of interest by globally distributed groups of researchers. The software implements a novel iterative, non-redundant circuit mapping approach. This approach was validated by mapping a subset of neurons in a proprio-motor circuit of the *Drosophila melanogaster* larval ventral nerve cord. We compared the reconstruction speed and accuracy from our approach to state-of-the-art, redundant methods. Results yielded similar levels of accuracy at a faster reconstruction speed for our approach. Detailed analyses suggest that cellular neuroanatomy of connectivity of *Drosophila* neurons are decisive for the achieved accuracy. These properties generalize to *Drosophila* neurons at different life stages and cell types, and enable robust and efficient mapping of neural circuits in *Drosophila*. The toolkit is currently applied to map circuits across the phylogenetic tree including mammals.

I applied this novel mapping approach to investigate how synaptic circuits and their properties change between developmental stages using the *Drosophila* nociceptive system as a model. Previous studies suggest that noxious stimulation causes behavioral phenotypes at the late stages of larval development that are absent at early stages. The question thus arises how the underlying synaptic circuits for nociception change across development. Volumetric EM datasets were obtained from several individuals using large-scale, serial-section transmission electron microscopy. Our novel circuit mapping method was applied to reconstruct the class IV multi-dendritic nociceptors and their postsynaptic circuitry at both early and late developmental stages. Changes in synaptic connectivity patterns and morphological properties of neurons were investigated between early and late developmental stages. Results revealed that the general organization and synaptic connectivity of all nociceptive postsynaptic interneurons were preserved from the early to the late stages. Moreover, across developmental stages, interneuron arbors grew considerably and synapse numbers increased 3-4-fold. However, the proportion of the nociceptor inputs relative to the total number of dendritic synaptic inputs remained similar and was cell type-specific. Furthermore, different types of local interneurons receive inputs from different subsets of somatotopically-organized nociceptors, suggesting parallel, specialized pathways for noxious signal processing. The newly identified interneuron types and their genetic driver lines provide a basis for future research to dissect this tractable model system for nociception.

In summary, this work contributes tools and methods towards mapping, analyzing and visualizing large-scale neural circuits derived from volumetric EM and demonstrates their practical applicability. This work hints at the tremendous potential of circuit mapping studies to elucidate the relationship of synaptic circuit maps to neural function and animal behavior.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entdeckung der algorithmischen Prinzipien der Funktion von Nervensystemen ist eine der grossen wissenschaftlichen Herausforderungen unserer Zeit. Die Rekonstruktion der Struktur von neuronalen Schaltkreisen ist erforderlich um Fortschritte in unserem Verständnis dieser Prinzipien zu erlangen. Die Struktur der neuronalen Schaltkreise kann durch die Rekonstruktion von Neuronen Morphologien und der Markierung von synaptischen Verbindungen mittels Elektronenmikroskopie (EM) erhalten werden. Das Nanometer-Auflösungsvermögen von EM und automatisierte Erfassungsmethoden erlauben grosse Mengen an 3D-Bilddaten von Nervengewebe routinemässig und auf grossen Skalen zu erzeugen. Die Extraktion und Analyse neuronaler Schaltkreise ist jedoch langsam und mühsam und stellt daher den Haupt-Engpass dar für die Gehirnrekonstruktion.

In dieser Arbeit haben wir eine neuartige, web-basierte Open-Source-Software-Umgebung für neuronale Schaltkreis Kartierung, Analyse und Visualisierung (catmaid.org) entwickelt. Die Umgebung ermöglicht global verteilten Forschergruppen eine schnelle, genaue und kooperative Kartierung von interessanten, neuronalen Schaltkreisen in sehr grossen 3D-EM-Bilddatensätzen. Als Machbarkeitsstudie haben wir einen Proprio-Motor-Schaltkreis in der *Drosophila melanogaster* Larve kartiert, sowie neuartige Zelltypen identifiziert und eine Vielzahl von Verschaltungsmotiven analysiert. Wir demonstrieren, wie die neuroanatomischen Eigenschaften von *Drosophila* Neuronen unserem Kartierungsverfahren Robustheit verleiht. In einer Validierungsstudie zeigen wir weiter, dass unser iterative, nicht-redundante Kartierungsansatz ein Mehrfaches schneller ist als aktuelle, redundante Methoden und exakte Schaltpläne generieren kann. Der interaktive Aspekte der Analyse und Visualisierung in Echtzeit, sowie die reibungslose Navigation von Bilddaten und Schaltkreismerkmalen in unserer Umgebung, sind von entscheidender Bedeutung für die Erforschung und das Verständnis von Schaltungsstrukturen in *Drosophila* und möglicherweise auch andere Nervensystem.

Als nächstes haben wir weitere *Drosophila* Larven Schaltkreise auf der synaptischen Ebene kartiert und zwischen Individuen und über Entwicklungsstadien verglichen. Bei den späten Larven Entwicklungsstadien verursacht schädliche Stimulation bestimmte Verhaltensphänomene, die in einem frühen Stadium nicht vorhanden sind. Wir untersuchten die offene Fragestellung, inwiefern sich die zugrunde liegenden synaptischen Verschaltung für Nozizeption über die Entwicklung ändert. Wir haben die class IV Nozizeptoren und ihre nachgeschalteten Interneuronen im zentrale Nervensystem in frühen und späten Entwicklungsstadien mittels grossen Serienschnitten von Transmissionelektronenmikroskopie abgebildet. Wir fanden, dass die allgemeine Organisation und die Verschaltung von 14 identifizierten Interneuronentypen von frühem bis spätem Stadium erhalten bleibt. Überraschenderweise bleibt auch nach erheblichen Wachstum von Interneuronen und der 3-4-fache Erhöhung der synaptischen Verbindungen von frühem bis spätem Stadium der Anteil der Nozizeptoren

Typ-spezifische synaptische Eingänge in beiden Stadien erhalten. Darüber hinaus erhalten verschiedene Arten von lokalen Interneuronen einen zelltypspezifische Eingang von den somatotopisch organisierten Nozizeptoren, was auf parallele, potentiell spezialisierte, Leitbahnen für die Transduktion von schädlich Signalen hinweist. Die neu identifizierten Interneuronen können mit genetischen Methoden weiter funktionell analysiert werden und tragen zur Etablierung dieses Model-Systems für die Untersuchung von Nozizeption bei.

Zusammenfassend haben wir Werkzeuge und Methoden für die Kartierung, Analyse und Visualisierung von neuronalen Schaltkreise abgeleitet von grossen, volumetrischen Elektronenmikroskopie Datensätzen beigetragen. Wir verwendeten diese neuen Werkzeuge und Methoden, um verschiedene neuronale Schaltkreise zu extrahieren und haben damit verschiedene neurobiologische Fragen adressiert. Dabei haben wir das enorme Potenzial dieser Werkzeuge für zukünftige Studien gezeigt, die unser Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen oder für vergleichende Fragestellungen in den Neurowissenschaften, voranzubringen. Zukünftige Studien werden nun weiter die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der neuronalen Schaltungsstruktur charakterisieren können in verschiedenen Individuen, Spezies, in verschiedenen Entwicklungsstadien oder in Gehirnen von gesunden und erkrankten Personen.