



## Doctoral Thesis

# 3D laser-scanning techniques for two-photon calcium imaging of neural network dynamics in vivo

**Author(s):**

Göbel, Werner

**Publication Date:**

2008

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005595558> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 17655

**3D laser-scanning techniques for two-photon  
calcium imaging of neural network dynamics  
*in vivo***

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
Werner Göbel  
Diplom-Physiker, University of Heidelberg  
born March 17th, 1979  
citizen of  
Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Rodney J. Douglas, examiner  
Prof. Dr. Fritjof Helmchen, co-examiner  
Prof. Dr. Kevan A. C. Martin, co-examiner

2008

# Zusammenfassung

Im Gehirn ist die uns umgebende Welt als koordinierte Erregungsmuster definierter neuronaler Populationen repräsentiert. Diese Muster werden in höheren Hirnarealen weiterverarbeitet, integriert und ausgewertet, was unter bestimmten Voraussetzungen Aktivität in Gruppen von Motorneuronen hervorruft, welche wiederum gewisse Verhaltensmuster erzeugen. Trotz der fundamentalen Wichtigkeit des neuronalen Populationscodes ist wenig über grundsätzliche Eigenschaften und Wirkprinzipien lokaler neuronaler Netzwerkaktivität bekannt. Der Grund hierfür ist, dass die Untersuchung des Populationscodes gleichzeitige Aktivitätsmessungen vieler Neurone im intakten Gehirn erfordert, um Populationsaktivität in Verbindung zu bestimmten Sinnesreizen oder Verhaltensmustern zu setzen. Derartige Messungen sind technisch schwierig und blieben deshalb bisher unvollständig und rudimentär.

Bildgebende Verfahren sind vorzüglich für die Untersuchung von Populationsaktivität geeignet. Zwei-Photonen Laser-Scanning Mikroskopie (2PLSM) hat den zusätzlichen Vorteil, dass sie hochaufgelöste Studien funktioneller Aktivität im intakten Gehirn (*in vivo*) ermöglicht. Dynamische Messungen mittels 2PLSM mit einer zeitlichen Auflösung unter einer Sekunde waren jedoch bisher auf zwei Dimensionen beschränkt wegen der eingeschränkten zeitlichen Auflösung des Laser-Scannens in 3D. Der dreidimensionale Aufbau neuronaler Schaltkreise erschwerte deshalb weitergehende Studien von Populationsaktivität.

In dieser Doktorarbeit werden neuartige 3D Laser-Scanning Verfahren eingeführt, welche weitergehende Einblicke in den dreidimensionalen, funktionellen Aufbau von neuronalen und glialen Schaltkreisen *in vivo* ermöglichen. Zwei galvanometrische Scanspiegel wurden für das Scannen in  $x - y$  benützt und ein piezoelektrisches Fokussierelement für schnelles Scannen in  $z$ -Richtung. Um Fluoreszenzmessungen somatischer Kalziumsignale mehrerer hundert, in 3D verteilter Zellen zu ermöglichen, entwickelten wir eine dreidimensionale Linienscan Technologie für die Zwei-Photonen Mikroskopie. Die Methode basiert auf einer sinusförmigen Schwingung des Mikroskopobjektivs, welche auf geeignete Bewegungen der galvanometrischen  $x - y$  Scanspiegel abgestimmt ist, so dass der Fokus des Laserstrahls wiederholt eine geschlossene Trajektorie in 3D durchläuft. Mittels derartigen 3D Scanlinien konnte so die Aktivität von mehr als 90% der in Volumina von bis zu 250  $\mu\text{m}$  Seitenlänge enthaltenen Zellkörper gemessen werden. Unspezifische Färbung

mit einem kalziumsensitiven Fluoreszenz-Farbstoff erlaubte es, *in vivo* räumlich-zeitliche Erregungsmuster neuronaler und astrozytischer Netzwerke im Neokortex von Ratten zu messen.

Daraufhin erweiterten wir die 3D Scanmethode um räumlich-zeitliche Messungen von Dendriten zu ermöglichen. Aufgrund ihrer verschiedenartigen morphologischen und physiologischen Charakteristika sind Dendriten grundlegend für synaptische Integration und Signalverarbeitung in neuronalen Schaltkreisen. Umfassende Messungen des gesamten Dendriten sind deshalb von grundsätzlicher Bedeutung, um die komplexen Mechanismen der Signalverarbeitung in einzelnen Zellen zu verstehen. Wir entwickelten deshalb eine Methode um von Ebenen beliebiger 3D Orientierung zu messen, welche sich insbesondere als vorteilhaft erwies für die Messung von Kalziumsignalen in Parallelfasern und Dendriten von Purkinje Zellen. Weiterhin wandten wir frei definierbare Linienscans an - entweder durch mehrere Dendriten oder durch einen einzelnen senkrecht orientierten Dendriten - um schnelle dendritische Kalziumsignale in neokortikalen Pyramidalzellen aufzulösen. Um gleichzeitige Messungen von Kalziumsignalen entlang mehrerer apikaler Dendriten zu ermöglichen, entwickelten wir das Band-Scannen, welches funktionelle Messungen von benutzerdefinierten, gekrümmten Ebenen erlaubt. 3D Scantechniken erleichtern die optische *in vivo* Messung der Funktionsweise von Dendriten.

Insgesamt eröffnen die hier vorgestellten, neuartigen 3D Scanmethoden die Möglichkeit umfassender Studien lokaler Netzwerkdynamik. Die Methoden können zur Untersuchung jeglicher Art von Gewebe angewandt werden, in welchen die koordinierte Aktivität dreidimensional aufgebauter zellulärer Netzwerke grundlegend ist. Für Neurowissenschaftler bietet das 3D Laser-Scannen neue Möglichkeiten, Prinzipien neuronaler Verarbeitung sowohl auf Einzelzellniveau als auch auf der Ebene lokaler Schaltkreise, zum Beispiel innerhalb einer kortikalen Kolumne, zu untersuchen. Die vorgestellten Methoden eröffnen daher vielversprechende Möglichkeiten, um die Lücke zwischen grob-auflösenden bildgebenden Verfahren und funktioneller Bildgebung auf Einzelzellniveau zu schliessen.

# Summary

In the brain, the outside world is represented as coordinated patterns of activity in defined neuronal populations. These patterns are further processed, integrated and evaluated in higher-order areas, eventually resulting in activity patterns of motoneuron populations that generate behavior. Despite the fundamental importance of population codes, little is known about basic characteristics and the principles of operation of local neural network activity. The reason is that the investigation of population codes requires simultaneous recordings from many neurons in the intact brain in order to relate population activity to sensory input or behavioral output. These measurements are however technically extremely difficult and so far have remained incomplete and rudimentary.

Imaging techniques are particularly well suited to study population activity. Two-photon laser-scanning microscopy (2PLSM) has the additional advantage that it enables high resolution functional imaging in the intact brain *in vivo*. Dynamic 2PLSM measurements with subsecond time resolution were so far done in 2D because of the restricted temporal resolution of laser-scanning in 3D. The three-dimensional organization of neural circuits impeded comprehensive studies of population activity.

In this Ph.D. thesis novel 3D laser-scanning modes for two-photon microscopy were developed that can reveal insights into the three-dimensional functional architecture of neuronal and glial circuits in the intact brain *in vivo*. Two galvanometric scan mirrors were used for  $x - y$  scanning and a piezoelectric focusing element for rapid scanning in the  $z$ -dimension. To permit fast functional fluorescence measurements of somatic calcium signals from several hundred cells distributed in 3D space we developed a three-dimensional line-scan technology for two-photon microscopy. The method is based on the sinusoidal vibration of the microscope objective combined with 'smart' movements of the galvanometric  $x - y$  scanners to repeatedly scan the laser focus along a closed 3D trajectory. More than 90% of cell somata were sampled by the scan line within volumes of  $250 \mu\text{m}$  side length. Using bulk-loading of calcium indicator, this method was successfully applied to reveal spatiotemporal activity patterns in neuronal and astrocytic networks in the rat neocortex *in vivo*.

Then we adapted 3D scanning to spatio-temporally resolved imaging from dendrites. Dendrites with their diverse morphological and physiological features are essential for synaptic integration in single neurons and signal processing in neuronal circuits. Compre-

hensive measurements of the entire dendritic tree are therefore essential to understand the complex mechanisms of signal processing in single cells. We developed a method to image planes arbitrarily oriented in 3D, which proved particularly beneficial for calcium imaging of parallel fibers and Purkinje cell dendrites in rat cerebellar cortex. Furthermore, we applied free line scans - either through multiple dendrites or along a single vertically oriented dendrite - to reveal fast dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. To enable simultaneous measurements of calcium signals along multiple apical dendrites we invented a ribbon-type 3D scanning method for imaging user-defined convoluted planes. These novel scanning modes will facilitate optical probing of dendritic function *in vivo*.

In summary, these novel 3D modes for laser scanning microscopy open the field for comprehensive studies of local cellular network dynamics. The methods can be broadly applied to any type of tissue, in which the coordinated activity of three-dimensionally organized cell networks is essential. For neuroscientists 3D laser scanning provides a new means to reveal principles of neural processing on the level of single cells and microcircuits, for example, within a cortical column, and thus is highly promising to bridge the gap between large-scale and single-cell functional imaging.