



Doctoral Thesis

High-speed acousto-optic imaging of neuronal network activity in the intact mouse brain

Author(s):

Grewe, Benjamin Friedrich

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006186885> →

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](#).

Dissertation ETH No. 19175

High-speed acousto-optic imaging of neuronal network activity in the intact mouse brain

A Dissertation submitted to
ETH ZURICH
for the Degree of Doctor of Sciences

Dissertation presented by

Benjamin Friedrich Grewe
Diplom Physiker, University of Heidelberg
born December 14th, 1980, Ahlen, Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Richard Hahnloser, examiner ETH
Prof. Dr. Fritjof Helmchen, co-examiner UNI-ZH
Prof. Dr. Markus Rudin, co-examiner ETH

Year 2010

Summary

High-speed acousto-optic imaging of neuronal activity in the intact mouse brain.

In the mammalian brain stimuli that are received from the outer world are represented as coordinated patterns of activity in neuronal populations. These patterns are processed, integrated and evaluated in higher-order brain areas on a time scale that ranges from a few to hundreds of milliseconds. Investigating these neuronal activity pattern therefore requires a measurement technique that provides an adequate temporal resolution. While large-scale electrical recordings can measure population spiking activity in behaving animals, the speed of optical neuronal activity measurements so far has been limited to several Hertz (1-30 *Hz* typical rate). Nevertheless optical methods feature some crucial advances compared to electrical measurements, such as the possibility to sample complete local network populations, the revealing of specific cell types, the detection of inactive neurons and they enable to obtain spatial relationships of individual neurons within their network.

Overcoming previous scanning speed limitations, here we demonstrate a novel improved version of a 2-photon laser scanning microscope for *in vivo* imaging that employs an orthogonal pair of acousto-optic deflectors (AODs) which allowed real-time measurements of neuronal network activity. Using an effective dispersion compensation unit (DCU) we compensated for the dispersive effects that were caused by the AOD-scanners and succeeded to reshape the laser beam profile and the laser pulse length. Further microscope optimizations for best laser beam transmission resulted in a total transmission efficiency of about 25% (700 *mW*) below the objective. These optimizations together rendered our system suitable for *in vivo* imaging down to a depth of approximately 300 μm . The lateral microscope resolution of 1-1.6 μm thereby allowed a clear identification of neuronal cells and cell somata; axial resolution was 4.1-6 μm . The maximum total scanning field of 305 μm x 305 μm contained up to 200 neurons.

Employing a novel random-access-pattern-scanning (RAPS) mode with acousto-optic deflectors we were able to perform *in vivo* calcium imaging of mouse neocortex with greatly improved temporal resolution and obtained fluorescence measurements from 34-91 layer 2/3 neurons at 180-490 *Hz* sampling rate. Most important, the new scanning mode enabled us to detect single action potential-evoked fluorescence calcium transients with a signal-to-noise ratio of 2-5. In addition high-speed RAPS imaging of neuronal somata allowed us to determine neuronal spike times with a precision of a few milliseconds (5-15 *ms*). For analyzing higher frequent trains of action potentials we developed a new automated 'peeling' algorithm that enabled to reconstruct more complex spike trains from superimposed calcium fluorescence traces of up to 20-30 *Hz* AP-frequency.

Demonstrating the potential of the new AOD-scanning technique we could resolve spatiotemporal trial-to-trial variability of sensory evoked neuronal spiking responses for cell populations in the barrel and visual cortex of mice. We think that AOD 2-photon laser scanning in combination with RAPS and with an automated spike reconstruction will facilitate real-time investigations in neuronal network activity and thus will help to gain a more detailed understanding of how incoming information is processed in local neuronal networks of the mammalian brain. We assume that a better understanding of the modes of neuronal network operation finally also may help to analyze dysfunctions of such neuronal networks which are prevalent in several brain diseases.

Zusammenfassung

Schnelle akusto-optische Messungen neuronaler Netzwerkaktivität im intakten Gehirn von Mäusen.

Sinnesreize aus der uns umgebenden Welt werden im Gehirn in Form von definierten elektrischen Erregungsmustern in dichten Netzwerken von Nervenzellen abgebildet. Die Reizverarbeitung geschieht dabei über die zeitliche Abfolge von Nervenzellimpulsen, welche sich üblicherweise innerhalb einiger Tausendstel bis Hundertstel Sekunden abspielt. Um die Informationsverarbeitung in neuronalen Netzwerken zu verstehen, ist es daher entscheidend, Messmethoden mit hinreichender zeitlicher Auflösung zu entwickeln. Während direkte elektrische Messungen neuronaler Aktivität mit Hilfe von Elektroden eine sehr hohe zeitliche Auflösung bieten, können optische Messungen bisher die neuronalen Impulsmuster nur ungenügend, mit einigen Hertz, auflösen (max. 10-15 Hz Messrate). Trotzdem bieten optische Messmethoden gegenüber elektrischen entscheidende Vorteile wie z.B. die Möglichkeit, komplette Zellnetzwerke zu messen, spezielle Zelltypen zu unterscheiden oder auch die räumliche Organisation der Neuronen mit einzubeziehen.

Im Hinblick auf die Geschwindigkeit bei optischen Messungen ist es im Rahmen dieser Arbeit nun gelungen, ein neuartiges 2-Photonen Mikroskop zu entwickeln, welches über zwei orthogonal angeordnete akusto-optische Deflektoren (AODs) schnelle Echtzeitmessungen neuronaler Aktivität erlaubt. Mit einer effektiven Kompensation der räumlichen und zeitlichen Dispersionseffekte, welche von den akusto-optischen Kristallen erzeugt werden, gelang es, das Anfangsprofil des Laserstrahls und die ursprüngliche Pulslänge wiederherzustellen. Die Laserstrahltransmission des optimierten Mikroskops erreichte dabei ca. 25%, was ca. 700 mW unter dem Objektiv entspricht. Die maximal verfügbare Laserintensität ermöglichte *in vivo* Messungen neuronaler Aktivität in Gewebetiefen bis zu 300 μm . Die laterale Auflösung des AOD-Mikroskops von 1-1,6 μm reichte aus, um Zelltypen und neuronale Zellsomata eindeutig zu identifizieren (z -Auflösung 4.1-6 μm). Das gesamte 2D-Scanfeld von 305 μm x 305 μm beinhaltete dabei bis zu 200 Neurone.

Unter Verwendung einer neu entwickelten Scanning-Methode (RAPS), bei dem kleine Punktraster innerhalb der Neurone gescannt werden, war es möglich, Kalziumfluoreszenzsignale von 34-91 Neuronen in neokortikaler Schicht 2/3 mit Messraten von 180-490 Hz aufzunehmen. Dabei erlaubte es die neue RAPS-Messmethode, sogar Kalziumfluoreszenzsignale aufzunehmen, welche durch einzelne neuronale Zellimpulse erzeugt wurden (Signal-Rausch-Verhältnis von 2-5). Zudem war es möglich, die Impulse der Nervenzellen mit einer Genauigkeit von 5-15 ms zu rekonstruieren. Auch höher frequente Zellaktivität, welche zu Überlagerungen der Kalziumsignale führt, konnte mit Hilfe eines neu entwickel-

elten Algorithmus zur automatischen Fluoreszenzdatenanalyse bis zu einer Aktivitätsfrequenz von 20-30 Hz aufgelöst werden.

Durch Anwendung der neuen AOD-Scantechnik gelang es uns, zeitlich und räumlich verteilte Aktivität von neuronalen Zellpopulationen im barrel-Kortex und im visuellen Kortex von Mäusen bei wiederholter Stimulation aufzunehmen. Wir denken, dass die schnelle AOD 2-Photonen Laser Scantechnik in Kombination mit dem RAPS Scanverfahren und dem Algorithmus zur automatischen Fluoreszenzdatananalyse in Zukunft optische Echtzeitmessungen neuronaler Aktivität ermöglichen wird. Mit dem neuen Messverfahren lässt sich demnach die Informationsverarbeitung in neuronalen Netzen des Gehirns sehr viel detaillierter und umfassender untersuchen und auch visualisieren. Ein verbessertes Verständnis der Prinzipien der normalen, nicht gestörten Informationsverarbeitung im Gehirn kann letztendlich auch für die Erforschung von Fehlfunktionen neuronaler Netzwerke wie zum Beispiel bei Hirnerkrankungen von entscheidendem Vorteil sein.