

DISS. ETH No. 19936

**A flexible software framework
and post hoc cell type discrimination
for *in vivo* two-photon calcium imaging
of neuronal population activity**

DISSERTATION

submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

DOMINIK LANGER

Dipl. natw. ETH

born 12th of December 1978

citizen of Zurich (ZH), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Kevan A.C. Martin, examiner, ETH Zurich

Prof. Dr. Fritjof Helmchen, co-examiner, University of Zurich

Prof. Dr. Jean-Marc Fritschy, co-examiner, University of Zurich

2011

Zusammenfassung

Der Neocortex, insbesondere der des Menschen, wird als die komplexeste Struktur im bekannten Universum betrachtet. Funktionell gesehen ist er massgeblich beteiligt an höheren Gehirnfunktionen wie der Verarbeitung von sensorischer Information, der motorischen Kontrolle des Körpers, sowie kognitiven Prozessen. Strukturell gesehen umschliesst er die beiden Gehirnhemisphären als eine 1-4 mm dicke Schicht und besteht aus einem hochkomplexen Netzwerk miteinander verbundener Zellen. Obwohl während der letzten Jahrzehnte eine riesige Menge anatomischer und physiologischer Daten über den Neocortex gesammelt worden sind, ist die funktionelle Organisation des neocorticalen neuronalen Netzwerkes nach wie vor nur ansatzweise verstanden. Sicher ist jedoch, dass Information im Neocortex als Fluktuationen der Zellmembranpotentiale, welche sich durch das neuronale Netzwerk fortpflanzen, repräsentiert und verarbeitet wird. Wir fassen diese elektrischen Potentialfluktuationen unter dem Begriff *neuronale Aktivität* zusammen.

Wegen seiner Eindringtiefe von bis zu einem Millimeter und seiner hohen dreidimensionalen räumlichen Auflösung hat sich die Zweiphotonenmikroskopie (2PM) zur Methode der Wahl entwickelt, wenn es darum geht, Populationen von Neuronen innerhalb des Neocortex lebender Tiere zu beobachten. In Kombination mit Techniken, welche es ermöglichen, mehrere hundert Zellen mit fluoreszenten Indikatoren neuronaler Aktivität (insbesondere Calciumindikatoren) zu beschicken, wurde es möglich, die Aktivität neuronaler Zellpopulationen im Gehirn *in vivo* (d.h. im lebenden Tier) zu beobachten.

Forscher, welche 2PM für Messungen am intakten, lebenden Gehirn einsetzen, haben in der Regel hohe Ansprüche an Flexibilität und verwenden daher oft selbstgebaute oder kundenspezifisch angefertigte Mikroskopaufbauten, welche von eigens entwickelter Software angesteuert werden. Wegen der kontinuierlichen technologischen Weiterentwicklung in diesem Forschungsfeld hat sich ein Bedürfnis nach einer Software-Lösung herauskristallisiert, welche sowohl dem Forscher Zugriff auf die neuesten Bildaufnahmetechniken gewährt, als auch dem Entwickler eine solide Ausgangsplattform zur Verfügung stellt, mit welcher Erweiterungen einfach implementiert und neue Ideen rasch realisiert werden können. Im ersten Teil dieser Doktorarbeit stelle ich HelioScan, ein mit LabVIEW entwickeltes Software-Paket vor. Es dient a) als eine Sammlung von Komponenten, aus welchen eine Ansteuerungs- und Bilderfassungs-Anwendung flexibel entsprechend den eigenen Bedürfnissen zusammengesetzt werden kann, und b) als ein Gerüst (Framework), innerhalb dem neue Funktionalität schnell und strukturiert implementiert werden kann.

Definiert durch vom Benutzer erstellte Konfigurationsdateien setzt sich eine HelioScan-Anwendung zu Laufzeit aus einzelnen Software-Komponenten zusammen. Dieser Ansatz

erlaubt eine hohe Flexibilität in Bezug auf vorhandene Hardware und funktionelle Anforderungen. Gegenwärtig verfügbare Komponenten erlauben a) kamera-basierte Aufnahmemodi wie z.B. zur Messung des intrinsischen optischen Signals von neuronalem Gewebe, sowie diverse laser-scanning-basierte Aufnahmemodi, basierend auf b) galvanometrischen Spiegeln und c) akusto-optischen Deflektoren (AODs). Die HelioScan-Komponenten sind in einem objektorientierten Ansatz implementiert. Generische abstrakte Klassen definieren sowohl die verschiedenen Arten von Komponenten, als auch deren mögliche Interaktionen. Neue Komponenten können erstellt werden, indem sie von existierenden Basisklassen abgeleitet werden. Diverse Gerüstklassen, welche sich ihrerseits von den generischen abstrakten Klassen ableiten, erlauben es, von bereits implementierter Funktionalität Gebrauch zu machen. Dank dieser komponentenbasierten Systemarchitektur unterstützt HelioScan auch kollaborative Ansätze, in welchen mehrere Entwickler gleichzeitig an neuer Funktionalität arbeiten.

Die zellulären Komponenten des neocorticalen neuronalen Netzwerkes zeigen eine hohe Diversität in Bezug auf ihre morphologischen, physiologischen und molekularen Eigenschaften. Diese Diversität ist jedoch nicht kontinuierlich, so dass Gehirnzellen durchaus verschiedenen Klassen mit gemeinsamen oder zumindest ähnlichen Eigenschaften zugeordnet werden können. Diesen Klassen (Zelltypen) wiederum können zunehmend unterschiedliche Funktionen im neuronalen Netzwerk zugeordnet werden. Daher ist es wichtig, dass auch bei der 2PM unterschiedliche Zelltypen unterschieden werden können. In einem zweiten Teil dieser Doktorarbeit stelle ich daher drei Methoden zur Zelltypunterscheidung bei funktionellen Calcium-Bildgebungsexperimenten im intakten Neocortex vor.

Der erste Ansatz erlaubt es, inhibitorische Interneuronen (GABAerge Neuronen), Astrocyten und exzitatorische Neuronen zu unterscheiden und basiert auf drei fluoreszenten Farbstoffen, welche gleichzeitig beobachtet und spektral unterschieden werden können. Verwendet wird dabei eine Kombination der transgenen GAD67-GFP-Mauslinie, in welcher GABAerge Neuronen grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren, sowie dem roten, astrocyten-spezifischen Farbstoff Sulforhodamin 101 und dem grünen, unspezifischen Calcium-Indikator Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1).

Die zweite Methode benützt eine Immunfärbung im Anschluss (d.h. post-hoc) an ein *in vivo* durchgeführtes two-photon laser-scanning microscopy (2PM)-Experiment, um Zellen anhand ihrer Expression molekularer Marker zu unterscheiden. Nach dem funktionellen Calcium-Bildgebungsexperiment und der Aufnahme eines dreidimensionalen Referenzbildstapels wird das Gehirn fixiert und anschliessend in coronale Scheiben geschnitten. Diejenigen Scheiben, welche das zu untersuchende Volumen enthalten, werden anhand des Blutgefässmusters auf ihrem dünnen Streifen Gehirnoberfläche identifiziert. Nach der Immunfärbung werden dreidimensionale Bildstapel von den entsprechenden Bereichen dieser Scheiben aufgenommen und im Computer so rotiert, dass ihre Orientierung der ursprünglichen Referenzbildstapels entspricht. Zellen im Referenzbildstapel werden dann in den Bildstapeln der gefärbten Schnitte identifiziert und ihre Markerkombination festgestellt. Ich habe die Anwendbarkeit dieser Methode demonstriert, indem ich GABAerge

Zellen anhand ihres Expressionsmusters von calciumbindenden Proteinen unterschieden habe.

Die dritte Methode ist ähnlich der zweiten, verwendet aber ein Schneideverfahren, welches in bereits optimal ausgerichteten tangentialen Schnitten resultiert. Dieser Ansatz muss noch weiter optimiert und charakterisiert werden, erste Resultate zeigen aber, dass Zellen, welche zuerst *in vivo* beobachtet wurden, sehr einfach in den Schnitten wiedergefunden werden können.

Zusammengefasst habe ich in dieser Doktorarbeit zwei neue, flexible und erweiterbare Werkzeuge eingeführt. HelioScan hat meiner Meinung nach das Potential, zur Software der Wahl in 2PM-Laboratorien zu werden, welche einen hohen Grad an Diversität bei Hardware oder Funktionalität aufweisen oder häufige Änderungen derselben bewältigen müssen. Das Aufkommen chronischer Präparationen erlauben es – dank virus-induzierter Expression genetisch kodierter Calciumindikatoren – über Wochen oder gar Monate vom selben Tier Daten zu erheben. Damit sinkt der relative Aufwand, welcher für eine anschliessende Zelltypdiskriminierung mittels Immunhistochemie aufgewendet werden muss. Ich erwarte daher, dass post-hoc-Zelltypdiskriminierung in Zukunft routinemässig angewendet werden wird.

Summary

The neocortex, especially that of humans, is considered to be the most complex structure in the known universe. Functionally, it is involved in higher order brain functions such as sensory processing, generation of motor commands, and cognitive processes. Structurally, it encloses the cerebral hemispheres as a sheet that is one to four millimetres thick and consists of a highly complex network of interconnected cells. Even though a wealth of anatomical and physiological data has been collected over the past decades, the functional organization of the neocortical microcircuitry is still a mystery. What is known for sure is that information is represented and processed in the neocortex as membrane potential fluctuations travelling through the neuronal network. We refer to such fluctuations as neuronal activity.

Due to its tissue penetration capabilities of up to one millimetre and its high spatial resolution with spatial resolution in three dimensions, *2PM* has become the method of choice to image populations of neurons inside the neocortex of living animals. In combination with techniques that allow to load populations of several hundred cells with fluorescent indicators of neural activity (in particular: calcium indicators), it is possible to observe neuronal population activity inside the brain *in vivo*.

Researchers performing *in vivo* 2PM often use custom-built microscopy setups controlled by custom-written software due to the high flexibility they require. The continuous technical advancement of the field created a need for new control software that is flexible enough to supply both the biological researcher with the newest image acquisition techniques and the developer with a solid platform from which various new extensions can be implemented and ideas quickly realised. In the first part of this thesis, I introduce HelioScan, a software package written in LabVIEW. It serves i) as a component collection allowing to flexibly assemble a microscopy control software according to the individual needs of a researcher, and ii) as a framework within which new functionality can be implemented in a quick and structured manner.

A specific HelioScan application assembles at run-time from individual software components, based on user-defined configuration files. This concept allows high flexibility with regard to different hardware or functional requirements. Currently implemented components enable i) camera-based imaging such as intrinsic optical signal (IOS) imaging, as well as different laser-scanning modes employing ii) galvanometric mirrors and iii) acousto-optic deflectors (AODs). Components are implemented in an object-oriented fashion, with generic interface classes defining the component types as well as their possible interactions. New components can be implemented by inheriting from existing base classes. Various scaffold classes derived from the generic interface classes provide functionality that can be quickly

extended. Due to its component-based architecture, HelioScan promotes collaborative efforts in which several developers work in parallel on implementing new functionality.

The cellular components of the neocortical neural network are diverse with respect to their precise morphology, physiology and molecular composition. Their diversity does not form a continuum, however. As a consequence, they can be grouped into different classes based on common, or, at least, similar features. Different functional roles can be attributed to these classes (cell types). Thus, it is important to be able to distinguish between different cell types in two-photon calcium imaging. In the second part of this thesis, I present three methods for cell type discrimination in two-photon calcium imaging of the neocortex.

The first of these methods allows one to distinguish between GABAergic cells, astrocytes and excitatory neurons. It is based on a preparation with three fluorescent labels that can be simultaneously imaged and spectrally resolved. In particular, it involves the GAD67-GFP transgenic mouse line (in which GABAergic neurons express green fluorescent protein (GFP)), the red dye sulforhodamine 101 (SR101) for astrocyte-specific labelling and unspecific loading with the green calcium indicator OGB-1.

The second method uses post hoc immunostaining to discriminate cells according to their expression of molecular markers. Specifically, after *in vivo* two-photon calcium imaging and the acquisition of a three-dimensional reference image stack, the brain is fixed and then cut into coronal sections. Slices containing parts of the volume-of-interest are selected based on the blood vessel pattern on their thin stripe of pial surface. After immunostaining, the slices are imaged and rotation-fitted to the reference image stack. Cell-to-cell assignment between reference image stack and slice image stacks allows cell type discrimination according to different combinations of molecular markers. In this thesis, I demonstrate the applicability of this approach by discriminating different GABAergic cells based on their expression of calcium-binding proteins both in GAD67-GFP mice and in wild type mice expressing a genetically encoded calcium indicator (GECI).

The third method is similar to the second one, but it uses a cutting procedure that results in tangential sections and provides intrinsic rotation-fitting. Although further exploration of this approach is still pending, the first results indicate that cells previously imaged *in vivo* can be easily re-identified in the sectioned brain.

In summary, I introduced two flexible and extensible tools. I expect HelioScan to become the software of choice in two-photon imaging laboratories that have to deal with diverse and frequently changing hardware and functionality requirements. The rise of chronic preparations based on viral-induced GECI expression allows activity read-outs to be recorded over weeks or months. Due to the associated decrease in the relative overhead, I expect post hoc cell type discrimination to become a technique that is routinely applied in future 2PM calcium imaging experiments.