

DISS. ETH No. 27648

DEVELOPMENT OF TECHNIQUES FOR NEUROIMAGING AT NANOSCALE

A thesis submitted to attain the degree of

Doctor of Sciences of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zürich)

Presented by

HUNG TRI TRAN

M.Sc. in Material Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology
(GIST), Republic of Korea

Born on 23.04.1990

Citizen of the Socialist Republic of Vietnam

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Gebhard F. X. Schertler, examiner

Prof. Dr. Marco Stampanoni, co-examiner

Dr. Celestino Padeste, co-examiner

Prof. Dr. Takashi Ishikawa, scientific advisor

2021

Abstract

A wide range of diseases is associated with alterations of the brain morphology. Multiscale three-dimensional visualization of continuous volumes of unstained brain tissue is important to gain insight to pathologically relevant processes of neurological diseases.

Many pathological processes in neurodegenerative disorders affect myelinated axons, which are a critical part of the neuronal circuitry. Cryo-ptychographic X-ray computed tomography (cryo-PXCT) in the multi-keV energy range is an emerging technology, which provides phase contrast at high sensitivity, allowing label-free and non-destructive three-dimensional imaging of relatively large continuous volumes of tissue. The first part of this thesis reports a pipeline for cryo-PXCT of hydrated and unstained biological human brain tissue of volumes beyond what is typical for X-ray imaging, combined with complementary methods. Four samples of a Parkinson's diseased human brain and five control samples from a non-diseased human brain were imaged using cryo-PXCT. In both cases, specific features were distinguished, such as neuromelanin-containing neurons, lipid and melanic pigments, blood vessels and red blood cells, and nuclei of other brain cells. In the diseased samples, several swellings containing dense granular material were observed, which were resembling clustered vesicles between the myelin sheaths arising from the cytoplasm of the parent oligodendrocyte, rather than the axoplasm. The pathological relevance of such swollen axons in adjacent tissue sections was further investigated by immunofluorescence microscopy for phosphorylated alpha-synuclein. Since cryo-PXCT is non-destructive, the large dataset volumes were used to guide further investigation of such swollen axons by correlative electron microscopy and immunogold labeling post X-ray imaging, a possibility demonstrated for the first time. Interestingly, protein antigenicity and ultrastructure of the tissue were preserved after the X-ray measurement. As many pathological processes in neurodegeneration affect myelinated axons, this work sets an unprecedented foundation for studies addressing axonal integrity and disease-related changes in unstained brain tissues.

The extreme complexity of the human brain prevents performing precise analysis of specific components of neuronal networks, for example, of the individual neurons' interactions in specified circuits. The second part of this thesis reports on the development of a novel compartmentalized neuronal co-culture platform allowing simulation of parts of neuronal networks with higher variable control. Polymer microstructures were fabricated on top of sapphire discs, which can direct the outgrowth of neurites originating from two distinct groups of neurons growing in different compartments. This was demonstrated using two populations of neurons expressing either EGFP or mCherry, which also facilitates the analysis of the specific interactions between two sets of cells. The design of device permits direct observation of neuritic processes within microchannels by optical microscopy with high spatial and temporal resolution to investigate the response of neurites projections to the guidance cues. Furthermore, the cell culture platform is compatible with high-pressure freezing. This allows cryo-preservation of reconstructed neuronal networks at near-native vitreous state for high resolution analysis by electron microscopy. Following freeze substitution, it is possible to process the resin-embedded neuronal networks via conventional methods for ultrastructural imaging via electron microscopy. Several key features of the embedded neuronal networks, including mitochondria, synaptic vesicles, axonal terminals, microtubules, with well-preserved ultrastructures were observed at high resolution using Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) and Serial sectioning - Transmission Electron Microscopy (TEM). These results demonstrate the compatibility of the platforms with both optical microscopy and electron microscopy. For future studies, the presented platform can be extended to disease models to allow investigating neurodegenerative processes at the nanoscale as well as pharmacological testing and drug screening.

In summary, the techniques for neuroimaging reported in this thesis can be considered as essential tools for investigating the ultrastructure of sub-cellular processes within neuronal networks in normal and disease conditions.

Zusammenfassung

Viele neurologische Erkrankungen sind mit morphologischen Veränderungen von Gehirnstrukturen verbunden. Die dreidimensionale Visualisierung kontinuierlicher Volumina von nicht spezifisch angefärbtem Hirngewebe über mehrere Grössenskalen ist wichtig, um Einblicke in pathologisch relevante Prozesse dieser Erkrankungen zu erhalten.

Pathologische Prozesse bei neurodegenerativen Erkrankungen betreffen oft myelinisierte Axone, welche zentrale Bestandteile der neuronalen Schaltkreise sind. Die ptychographische Röntgen-Computertomographie bei cryo-Temperaturen (cryo-ptychographic X-ray computed tomography, cryo-PXCT) im Energiebereich von mehreren keV ist ein neuartiges und vielversprechendes bildgebendes Verfahren, welches Phasenkontrast-Information bei hoher Empfindlichkeit liefert. Es ermöglicht eine markierungs- und zerstörungsfreie dreidimensionale Abbildung relativ großer kontinuierlicher Proben-Volumina, z.B. von Gewebeproben. Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt eine Pipeline für cryo-PXCT von hydratisiertem und nicht angefärbtem biologischem menschlichem Gehirngewebe, in Kombination mit komplementären Methoden. Vier Proben aus an Parkinson erkranktem menschlichem Gehirn und fünf Kontrollproben eines gesunden Gehirns wurden mittels cryo-PXCT abgebildet. In beiden Fällen konnten Gehirn-spezifische Merkmale identifiziert werden, wie Neuromelanin-haltige Neuronen, Lipid- und Melaninpigmente, Blutgefäße und rote Blutkörperchen sowie Zellkerne anderer Gehirnzellen. In den Proben von Erkrankten wurden mehrere Schwellungen beobachtet, die dichtes, körniges Material enthielten. Diese erschienen als gruppierte Vesikel zwischen den Myelinhüllen, die vermutlich eher aus dem Zytoplasma der ursprünglichen Oligodendrozyten stammten als aus dem Axoplasma. Die pathologische Relevanz dieser gequollenen Axone in benachbarten Gewebeschnitten wurde für die Immunfluoreszenzmikroskopie von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in Kombination mit multispektraler Bildgebung weiter untersucht. Da cryo-PXCT zerstörungsfrei ist, konnten die Bild-Daten der grossen Probenvolumina verwendet werden, um die geschwollenen Axone durch anschliessende Immunogold-Markierung und die korrelative Elektronenmikroskopie zu lokalisieren. Dieses Verfahren wurde hier erstmals erfolgreich angewendet. Interessanterweise blieben die Protein-Antigenität und die Ultrastruktur des Gewebes nach der Röntgenmessung erhalten. Da viele pathologische Prozesse bei der Neurodegeneration myelinisierte Axone betreffen, bildet diese Arbeit eine wegweisende Grundlage für zukünftige

Studien, die sich mit der Integrität der Axone und krankheitsbedingten Veränderungen in nicht angefärbten Hirngewebe befassen.

Die extreme Komplexität des menschlichen Gehirns verhindert die genaue Analyse bestimmter Komponenten neuronaler Netzwerke, beispielsweise der Interaktionen einzelner Neuronen in bestimmten Schaltkreisen. Der zweite Teil dieser Arbeit berichtet über die Entwicklung einer neuartigen in Kompartimente unterteilten Plattform für Co-Kulturen von Nervenzellen, welche die Simulation von Teilen neuronaler Netzwerke unter Kontrolle mehrerer Variablen ermöglicht. Auf Saphirsubstraten wurden Polymermikrostrukturen hergestellt, die das Wachstum von Neuriten leiten können. Diese stammen zum Beispiel von zwei unterschiedlichen Gruppen von Neuronen, die in den verschiedenen Kompartimenten auf dem Saphir-Träger wachsen. Dies wurde unter Verwendung von zwei Populationen von Neuronen demonstriert, welche entweder EGFP oder mCherry exprimieren, ein Ansatz, der auch die Analyse der spezifischen Wechselwirkungen zwischen zwei Populationen von Zellen vereinfachen wird. Das Design der Substrate ermöglicht die direkte Beobachtung neuronaler Prozesse innerhalb von Mikrokanälen durch optische Mikroskopie mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung, um die Reaktion von Neuriten-Ausläufern auf externe Signale zu untersuchen. Darüber hinaus ist die Zellkulturplattform mit Hochdruckgefrierprozessen kompatibel. Dies ermöglicht die Cryo-Konservierung rekonstruierter neuronaler Netzwerke in einem nahezu ursprünglichen Zustand, und die weitere Bearbeitung der Proben für die hochauflösende Analyse mittels Elektronenmikroskopie. Nach einer Gefriersubstitution ist es möglich, die in Harz eingebetteten neuronalen Netzwerke mit herkömmlichen Methoden für die Untersuchung der Ultrastruktur mittels Elektronenmikroskopie zu verarbeiten. Mehrere Schlüsselmerkmale der eingebetteten neuronalen Netzwerke, einschließlich Mitochondrien, synaptischer Vesikel, axonaler Terminals und Mikrotubuli mit gut erhaltenen Ultrastrukturen konnten mit hoher Auflösung abgebildet werden. Zum einen erfolgte dies mittels sequenziellem Abtrag mit einem fokussierten Ionenstrahl und anschließender Rasterelektronenmikroskopie (FIB-SEM), und zum anderen durch seriell Schneiden mittels Ultra-Mikrotom und anschließende Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Diese Ergebnisse demonstrieren die Kompatibilität der Plattform mit der optischen Mikroskopie wie auch mit der Elektronenmikroskopie. Für künftige Studien könnte die vorgestellte Plattform für die Untersuchung von Krankheitsmodellen erweitert werden. Dies würde die

Untersuchung neurodegenerativer Prozesse im Nanobereich sowie pharmakologische Tests und Wirkstoff-Screenings ermöglichen.

Zusammenfassend können die in dieser Arbeit beschriebenen Techniken als wesentliche Instrumente zur Untersuchung der Ultrastruktur subzellulärer Prozesse in neuronalen Netzwerken unter normalen und Krankheitsbedingungen angesehen werden.