

Investigating human neocortical architecture in 3D

Citation for published version (APA):

Hildebrand, S. (2021). *Investigating human neocortical architecture in 3D: new approaches for clearing, labelling and imaging large samples*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20211214sh>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20211214sh](https://doi.org/10.26481/dis.20211214sh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Light microscopy has been used extensively for well over a hundred years to study the neuroanatomy of the human brain. The aim of this thesis was to develop methodological aspects of histological tissue processing and microscopy, to overcome some shortcomings of conventional light microscopical investigations of human brain tissue. In particular, a novel histological tool called optical tissue clearing was employed, in order to render large brain samples transparent and thereby enable 3D imaging by allowing light to pass through them. Then, an imaging method called light-sheet fluorescence microscopy was used to quickly image large parts of those transparent samples. By combining these two technologies, large tissue samples of several millimetre thickness can be imaged in their entirety. This in turn reduces the need for computationally intense 3D reconstructions of thousands of paper-thin histological sections, which is the current standard approach to such large-scale imaging endeavours and requires substantial infrastructure only available in few research centres. Another advantage of imaging tissue slices that are orders of magnitude thicker than standard histological sections is the reduction of shearing and deformation, which is a common problem in very thin histological sections mounted onto glass slides.

In Chapter 2, this novel way to optically clear and label human brain samples for cytoarchitecture is presented. This method is called Multiscale Architectonic Staining of Human cortex (MASH). We show

the feasibility and scalability of this method by imaging the cytoarchitecture of the occipital neocortex with commercial light-sheet as well two-photon microscopes, with labels of different wavelength. It is further shown that mesoscopic datasets (datasets extending over large field of views of many millimetres to centimetres with resolutions in the single micrometre range) enable the relatively easy location of imaged regions in MRI (Magnetic Resonance Imaging) data on whole occipital lobes. The scope of application of the MASH method is further extended in Chapter 3 by adding a labelling protocol for angioarchitecture to the existing clearing and cytoarchitecture labelling. Using this method in combination with the mesoSPIM microscope, it could be shown that the vascular architecture between human visual areas V1 and V2 is distinct and that orientation profiles change as well as vessel densities change considerably over the cortical depth in a single area. The mesoSPIM is an open-source light-sheet microscope optimized for cleared, mesoscopic samples up to a few centimetres in size. It is hoped that the introduction of this angioMASH technique and similar protocols by other groups, will lead to a revival of the study of angioarchitecture, especially given its new relevance in the context of non-invasive functional imaging modalities such as fMRI (functional MRI) or fNIRS (functional Near-Infrared Spectroscopy). The angioMASH method could also play an important role in investigating human pathologies in which vessel abnormalities are observed, such as vascular dementia or certain forms of epilepsy. To advance the scope of MASH even further, a high-throughput version of this tissue-processing pipeline is shown in Chapter 4, which enables the optical clearing of multiple, whole coronal occipital lobe

slices. This high-throughput version utilises custom 3D printed laboratory equipment which is easily scalable and hence could facilitate the clearing a substantial volume of the human brain in a matter of days. Samples of this size would be impossible to image with conventional light-sheet microscope set-ups, however, as the excitation light enters the tissue laterally in those systems. Therefore, samples many centimetres in lateral extend need a different kind of light-sheet set-up, in which both orthogonal objectives are placed above the sample, a large sample chamber compatible with the imaging media, and a large stage travel range to cover the entire extend of the tissue slice. A prototype set-up of this kind, the ct-dSPIM (cleared-tissue dual view Selective Plane Illumination Microscopy) is introduced in Chapter 5. The versatility of this system is demonstrated by imaging very large samples of both human brain and prostate at multiple resolutions. The latter is achieved, not by changing objectives as in standard light microscopy, but rather by downsampling the acquired data. This is done both while acquiring it to reduce the data volume and further after the acquisition, to ultimately match the final in-plane resolution with the distance between the image planes - an imaging mode we termed MFS (Mesoscopic Fast Scans). These MFS scans allow for the acquisition of isotropic data at mesoscale resolutions over large volumes without the need of either multi-view deconvolutions or axial scanning of the (gaussian) light-sheet waist. Finally, to add to the repertoire of methods, a specialised clearing method termed hFRUIT is presented in Chapter 6. It is a version of the original FRUIT protocol (named after its ingredients fructose, urea and 1-thioglycerol) optimised for human

brain tissue labelled with lipophilic tracers. This non-delipidating aqueous clearing protocol is chemically gentle enough to those preserve lipophilic dyes, which is shown in both porcine and human brain tissue, while potent enough to clear human (and porcine) grey matter. hFRUIT could therefore become a powerful tool in the near future to investigate the intrinsic connectivity of the human neocortex, a methodologically challenging field to study because of the limited techniques available to date for selective, local labelling of these intrinsic connections.

Light microscopy has been a crucial tool for the investigation of human (and non-human) brain anatomy. Despite impressive developments in non-invasive brain imaging techniques, the microscopic probing of *post mortem* brain tissue will continue to play an essential part in neuroanatomy, because of its superior resolution. Yet many features of brain anatomy extend over large distances, which are difficult to capture with conventional microscopy. The mesoscopic features of brain architecture, extending over many millimetres to centimetres, but requiring microscopic resolution, are ideally suited for the novel field of 3D histology which combines optical tissue clearing techniques with 3D microscopy methods such as light-sheet microscopy. This thesis advances the 3D imaging of extensive volumes, by making it scalable to ever larger samples, allowing the imaging of structures of interest such as cortical layers observable in e.g. angio- and cytoarchitecture over considerable distances, while at the same time keeping it affordable for standard histology labs to implement.

Samenvatting

Lichtmicroscopie wordt al meer dan honderd jaar op grote schaal gebruikt om de anatomie van het menselijk brein te bestuderen. Het doel van het werk in dit proefschrift was om histologische weefselverwerking en -microscopie verder te ontwikkelen, en om enkele tekortkomingen van conventioneel lichtmicroscopisch onderzoek naar menselijk hersenweefsel te ondervangen. Allereerst werd een nieuwe histologische methode, *optical tissue clearing* (hierna: klaren), gebruikt om grote monsters van het brein transparant te maken. Dit maakte het mogelijk om er licht doorheen te laten schijnen. Vervolgens werd een 3D-beeldvormingstechniek, genaamd *light-sheet fluorescence microscopy*, gebruikt om met hoge snelheid grote delen van de transparante monsters in beeld te brengen. Door deze twee technieken te combineren, kunnen grote weefselmonsters van enkele millimeters dik in hun geheel in beeld worden gebracht. De huidige standaardbenadering voor dergelijke grootschalige beeldvorming is het maken van duizenden flinterdunne histologische secties, die vervolgens met rekenintensieve technieken in 3D gereconstrueerd worden. De substantiële infrastructuur die hiervoor vereist is, en die slechts in enkele onderzoekscentra beschikbaar is, kan met onze methode geheel uitgespaard worden. Een ander groot voordeel van onze methode, in tegenstelling tot het conventionele gebruik van duizenden op

glasplaatjes gemonteerde secties, is de vermindering van afschuiving en vervorming van het weefsel.

In Hoofdstuk 2 presenteer ik deze nieuwe methode om preparaten van het menselijk brein optisch te klaren en te labelen. Deze methode hebben we *Multiscale Architectonic Staining of Human cortex* (MASH) genoemd. Ik toon de haalbaarheid en schaalbaarheid van deze methode aan door de celstructuur van de occipitale neocortex in beeld te brengen met commerciële *light-sheet*- en *two-photon*-microscopen, met labels van verschillende golflengten. Verder is aangetoond dat het gebruik van mesoscopische beelden (beelden die zich uitstrekken over een groot gezichtsveld, van vele millimeters tot centimeters en met resoluties in het bereik van enkele micrometers) van de occipitaalkwab, het relatief gemakkelijk maken de beelden te vergelijken met MRI-beelden (*Magnetic Resonance Imaging*) van hetzelfde gebied.

Het toepassingsgebied van de MASH-methode wordt in Hoofdstuk 3 verder uitgebreid door een labelingsprotocol voor vasculaire structuur toe te voegen aan de bestaande klaring en celstructuurlabeling. Met behulp van deze methode, en in combinatie met de *mesoSPIM*-microscop, werden de menselijke visuele hersengebieden V1 en V2 met elkaar vergeleken. Ik kon aantonen dat de vasculaire architectuur tussen deze twee gebieden verschillend is. Tevens kon ik aantonen dat de oriëntatie van de bloedvaten, evenals de vaatdichtheden, aanzienlijk veranderen

wanneer men dieper in de cortex van een enkel gebied kijkt. De *mesoSPIM* is een open-source light-sheet-microscoop die is geoptimaliseerd voor geklaarde, mesoscopische preparaten die enkele centimeters dik kunnen zijn. Het is te hopen dat het gebruik van deze nieuwe techniek, die we *angioMASH* hebben genoemd, en soortgelijke protocollen door andere onderzoeksgroepen, zal leiden tot een heropleving van de studie van vasculaire architectuur, vooral vanwege de nieuwe relevantie hiervan in de context van niet-invasieve functionele beeldvormingstechnieken zoals fMRI (functionele MRI) of fNIRS (functionele *Near Infra-red Spectroscopy*). De *angioMASH*-methode zou ook een belangrijke rol kunnen spelen bij het onderzoeken van menselijke vaatpathologie, zoals vasculaire dementie of bepaalde vormen van epilepsie.

In Hoofdstuk 4 wordt een *high-throughput*-versie van deze weefselverwerkingspijplijn getoond, om het toepassingsgebied van *MASH* verder te vergroten. Deze *high-throughput*-versie maakt de klaring van meerdere, occipitaalkwab preparaten mogelijk en maakt gebruik van op maat gemaakte, 3D-geprinte, laboratoriumapparatuur. Deze is gemakkelijk en goedkoop opschaalbaar naar meer volume, wat het mogelijk moet maken om een (groot deel van het) menselijk brein in enkele dagen in beeld te brengen. Preparaten van deze omvang zouden onmogelijk kunnen worden afgebeeld met conventionele opstellingen met light-sheets, aangezien het licht in die systemen zijdelings het weefsel binnendringt.

Dergelijke monsters van vele centimeters dikte hebben een andere opstelling van de light-sheet nodig, waarbij beide orthogonale objectieven boven het monster worden geplaatst. Verder is een grote monsterkamer nodig, die compatibel is met de beeldvormende vloeistof. Tevens nodig is een groot bereik voor het verplaatsen van het podium waarop het monster staat, om zo het gehele monster te kunnen bereiken. Een prototype van dit soort opstelling, de ct-dSPIM (*cleared-tissue dual view Selective Plane Illumination Microscopy*) wordt geïntroduceerd in Hoofdstuk 5. De veelzijdigheid van dit systeem wordt gedemonstreerd door beeldvorming, in verschillende resoluties, van zeer grote preparaten van zowel menselijke hersenen als menselijke prostaat. Deze verschillende resoluties worden bereikt, niet door het camera-objectief te veranderen zoals bij standaard lichtmicroscopie, maar door de verkregen gegevens te downsamplen. Dit wordt zowel gedaan tijdens de dataverzameling, om het gegevensvolume te verminderen, als ook na de acquisitie, om de uiteindelijke resolutie in het vlak af te stemmen op de afstand tussen de beeldvlakken - een beeldvormingsmodus die we MFS (*Mesosopic Fast Scans*) hebben genoemd. Deze MFS-scans beslaan grote volumes, bestaande uit isotrope gegevens met resoluties op mesoschaal, zonder de noodzaak van deconvolutie of axiaal scannen.

Ten slotte wordt in Hoofdstuk 6, om nog een methode aan het repertoire toe te voegen, een gespecialiseerde methode voor het klaren, genaamd hFRUIT, gepresenteerd. Het is een versie van het

originele FRUIT-protocol (genoemd naar de ingrediënten fructose, ureum en 1-thioglycerol), geoptimaliseerd voor menselijk hersenweefsel dat gelabeld is met lipofiele tracers. Dit niet-delipiderende, waterige reinigingsprotocol is chemisch zacht genoeg om lipofiele kleurstoffen te behouden, wat wordt aangetoond in zowel varkens- als menselijk hersenweefsel. Tegelijkertijd is het krachtig genoeg om menselijke (en varkens) grijze massa te klaren. hFRUIT zou daarom in de nabije toekomst een krachtig hulpmiddel kunnen worden om de intrinsieke connectiviteit van de menselijke neocortex te onderzoeken – een methodologisch uitdagend veld, vanwege de beperkte technieken die tot nu toe beschikbaar zijn voor selectieve, lokale labeling van deze intrinsieke verbindingen.

Lichtmicroscopie is een essentieel hulpmiddel geweest voor het onderzoek van de menselijke (en niet-menselijke) hersenanatomie. Ondanks indrukwekkende ontwikkelingen in niet-invasieve hersenbeeldvormingstechnieken, zal het microscopisch onderzoek van post-mortem hersenweefsel een essentiële rol blijven spelen in de neuroanatomie, vanwege diens inherent hogere resolutie. Toch strekken veel kenmerken van de hersenanatomie zich uit over grote afstanden, die moeilijk vast te leggen zijn met conventionele microscopie. Deze mesoscopische kenmerken van de hersenarchitectuur, die zich uitstrekken over vele millimeters tot centimeters, maar een microscopische resolutie vereisen, zijn bij uitstek geschikt voor het nieuwe veld van 3D-histologie, dat optische weefselklaringstechnieken combineert

met 3D-microscopiemethoden zoals light-sheet microscopie. Dit proefschrift heeft als doel het verbeteren van de 3D-beeldvorming van grote volumes, door deze techniek schaalbaar te maken naar steeds grotere preparaten. Hierdoor wordt het mogelijk om belangrijke structuren, zoals corticale lagen, waarneembaar te maken in bijvoorbeeld vaat- en celstructuur in aanzienlijke volumes, terwijl het tegelijkertijd een haalbare techniek blijft voor histologische laboratoria.