



Connectomics: Neue Methoden zur dichten Rekonstruktion neuronaler Schaltkreise

Moritz Helmstaedter

Zusammenfassung

Das Nervensystem zeichnet sich durch eine besonders komplexe Zell-zu-Zell-Interaktion aus, welche vorwiegend durch chemische Synapsen erfolgt. Die Struktur dieses interzellulären Netzwerks zu kartieren ist eine wesentliche Herausforderung der Neurowissenschaften. Das in den letzten Jahren formierte Feld der Connectomics hat sich die methodische Aufgabe gestellt, die dichte Rekonstruktion immer größerer Nervenzellnetzwerke zu ermöglichen. Hierzu dienen automatisierte Volumenelektronenmikroskopie-Techniken für die Bildgebung. Die wesentliche Hürde ist jedoch noch immer die Datenrekonstruktion, für welche inzwischen ungewöhnliche Wege der Massenrekonstruktion mittels Schwarmintelligenz und Online-Computerspielen verfolgt werden.

Abstract

Connectomics: New methods for the dense reconstruction of neuronal circuits.

The nervous system is characterized by extremely complex cell-to-cell interactions which primarily occur via chemical synapses. Mapping the structure of these intercellular networks is one of the major challenges in Neuroscience. The new field of *Connectomics* which has been formed over the last years aims at the dense reconstruction of increasingly comprehensive nerve cell networks. Automated volume electron microscopy techniques are employed for image acquisition. A major obstacle, however, is data reconstruction, for which unusual solutions such as mass reconstruction by crowd sourcing and online computer games are currently pursued.

Keywords: connectomics; electron microscopy; neuronal circuits; image analysis; retina

Einleitung

Die Vermessung neuronaler Schaltkreise ist von jeher ein besonders wichtiges Ziel der Neurowissenschaften. Methodisch stellt sich die Herausforderung, Synapsen zu identifizieren und die beteiligten prä- und postsynaptischen Nervenzellfortsätze bis zu ihrem Ursprung (zumeist dem Zellkörper) zurückzuverfolgen (Abbildung 1A). Diese Aufgabe ist dadurch erheblich erschwert, dass Nervengewebe in fast allen Strukturen, jedenfalls im Zentralnervensystem, aus einer extrem dichten Packung von Nervenzellfortsätzen besteht. Das Gewebe ist so dicht, dass die Darstellung des gesamten lokalen Netzwerks in einem größeren Stück Nervengewebe lichtmikroskopisch unmöglich ist (Abbildung 1B). Daher war es methodisch von entscheidender Bedeutung, hochselektive Nervenzelldarstellungen zu gewinnen, wie sie die Silberfärbemethode Golgis vor mehr als 100 Jahren darstellte, und

wie sie die intrazellulären Farbstoffinjektionen seit bald 50 Jahren ermöglichten. Indem nur ein sehr kleiner Bruchteil der Nervenzellen dargestellt wurde (nur jede zehntausendste bis zu einer millionsten Nervenzelle), konnten Dendriten und Axone einzelner Nervenzellen rekonstruiert und synaptische Verschaltungen vorhergesagt oder nachgewiesen werden.

Um aber Nervenzellnetzwerke *dicht* zu rekonstruieren, das heißt, in einem gegebenen Volumen einen Großteil der Nervenzellfortsätze und ihrer synaptischen Verschaltungen zu kartieren, standen der Neurowissenschaft lange Zeit keine geeigneten Methoden zur Verfügung. Nervenzellfortsätze können sehr schmal werden, bis zu wenigen Dutzend Nanometern Durchmesser – und Nervenzellen erstrecken sich typischerweise über Hunderte Mikrometer oder gar mehrere Millimeter. Damit ergibt sich eine räumliche Skala, die hohe Auflösung über große Distanzen verlangt. Während Elektronenmikroskope

die benötigte Auflösung liefern, war die Darstellung der benötigten Volumina nur mit erheblichem Aufwand möglich: die Serienschicht-Transmissionselektronenmikroskopie (ssTEM) bedeutete, Tausende ultradünne Gewebeschnitte einzeln abzubilden und dann zu einem Bildvolumen zusammenzufügen. Lediglich für einen kompletten Schaltkreis wurde dies erfolgreich durchgeführt: die Rekonstruktion des *C. Elegans*-Konnektoms (White, Southgate et al. 1986), welches die Verschaltung von 302 Nervenzellen beschrieb, und dessen Erstellung 15 Jahre benötigte.

In Anbetracht dieser methodischen Grenzen war die Entwicklung automatisierter Volumen-Elektronenmikroskopietechniken im vergangenen Jahrzehnt ein erheblicher Durchbruch für die Analyse neuronaler Schaltkreise. Diese methodischen Fortschritte sollen im Folgenden zusammengefasst werden. Während die Bildgebungstechniken bereits weit entwickelt sind, stellt die Rekonstruktion der Nervenzellnetzwerke aus den Bilddaten weiterhin eine erhebliche Hürde dar, für deren Überwindung ungewöhnlicher Einsatz von menschlicher Schwarmintelligenz und Computern die bisher effektivste Lösung anbietet.

„Volumen“-Elektronenmikroskopie

In großen Teilen des Nervensystems ist das Nervenzellnetzwerk räumlich ungerichtet, isotrop. Die Hirnrinde der Säugetiere beispielsweise hat zwar eine radiale Vorzugsrichtung, die sich ontogenetisch erklärt, und an die sich die Apikaldendriten der Pyramidenzellen halten – für Axone aber, welche 90 Prozent der Nervenzellfortsätze bilden, ist eine Vorzugsrichtung mehrheitlich nicht vorhanden. Diese Isotropie aber bedeutet, dass die Bildgebung des Nervenzellgewebes alle drei räumlichen Dimensionen möglichst gleich behandeln sollte. Jedenfalls bestimmt in dieser Situation die kürzeste räumliche Dimension die Komplexität des dargestellten Nervenzellnetzwerks. Für neokortikales Gewebe zum Beispiel ist ein Bildvolumen von 2 mm x 2 mm x 75 µm viel weniger hilfreich als eines von 0.5 mm x 0.5 mm x 0.5 mm Größe, da letzteres einige Nervenzellschaltkreise komplett enthält, ersteres aber keine einzige gesamte Nervenzelle.

Die heutzutage in der *Connectomics* verwendeten Elektronenmikroskopietechniken sind entweder effizientere Varianten der Serienschicht-Elektronenmikroskopie, oder En-Bloc-Techniken (s. auch Briggman und Bock 2012). Alle sind bisher nicht ex-



Abb. 1: Herausforderungen der dichten Rekonstruktion von Nervenzellnetzwerken. A) Die Analyse synaptischer Schaltkreise erfordert Synapsendetektion, und die korrekte Verfolgung der prä- und postsynaptischen Neuriten zu den zugehörigen Zellkörpern. B) Neuropil ist typischerweise so dicht gepackt, dass konventionelle lichtmikroskopische Methoden eine Darstellung aller Nervenzellen nicht erlauben. Das skizzierte Volumen entspricht etwa dem Auflösungsvolumen konventioneller Lichtmikroskopie, es kann Dutzende Nervenfasern enthalten. C) Serielle Oberflächen-Rasterelektronenmikroskopie (SBEM) als Beispiel moderner Volumen-EM-Verfahren, die für die Connectomics Anwendung finden. A), B) aus Helmstaedter, Briggman et al. 2008; (C) Julia Kuhl und Winfried Denk mit freundlicher Genehmigung.

plizit 3-dimensional: Noch immer werden sukzessive 2-dimensionale Bilder aufgenommen, und das Gewebe wird entlang einer Achse geschnitten. Die Techniken unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Auflösung, Geschwindigkeit und dem Grad der Datenisotropie. Erst nach Zusammenfügung aller gewonnenen Bilder entsteht ein Bildvolumen – nur in diesem Sinne sind diese Techniken also Volumenabbildungsmethoden.

ssTEM mit Hochgeschwindigkeits-Kameras (TEMCA, (Bock, Lee et al. 2011)): Diese Methode beruht weiterhin auf händisch gewonnenen ultradünnen Gewebeschnitten, beschleunigt aber die Bildaufnahme erheblich durch schnelle Kamera-Arrays. Die gewonnenen Volumina sind daher sehr anisotrop, die Auflösung in der Bildebene sehr hoch (~4 nm), in Schnittrichtung deutlich niedriger (~40-70 nm)

ssSEM mit automatisierter Schnittgewinnung: automatisierte Band-Kollektions-Ultramikrotomie (ATUM) (Hayworth, Kasthuri et al. 2006). Der wesentliche Vorteil ist hier die automatisierte Schneidetechnik, bei der die Gewebeschnitte wie auf einem Förderband auf ein elektronendichtes Band aufgezogen werden. Die Bildgebung erfolgt dann in einem zweiten Schritt mit Rasterelektronenmikroskopen (da das Förderband elektronendicht ist). Vorteil ist die verbesserte Schnittdicke (20-25 nm) und die Entkoppelung von automatisiertem Schneiden und Bildgebung, welche dadurch parallelisierbar wird.

Serielle Block-EM (SBEM) ((Denk und Horstmann 2004), Abbildung 1C): Bei dieser En-Bloc-Technik wird der Gewebblock ungeschnitten in die Vakuumkammer des Elektronenmikroskops

eingebraucht. In der Vakuumkammer ist ein Diamantmesser-Ultramikrotom installiert, welches automatisch die Oberfläche des Gewebeblocks abschneiden kann. Es wird nun zunächst die Oberfläche des Gewebeblocks mit Rasterelektronenmikroskopie abgebildet und dann die bereits dargestellte Oberfläche abgeschabt. Damit entfällt die Notwendigkeit, ultradünne Gewebeschnitte in das EM einzubringen. Die Volumina sind deutlich isotroper (z.B. 300 μm x 300 μm x 80 μm , (Briggman, Helmstaedter et al. 2011)), und die Pixelgröße ca. 12 nm x 12 nm x 25 nm.

FIB-SEM: bei dieser En-Bloc-Technik ist das EM zusätzlich zum bildgebenden Elektronenstrahlgenerator mit einer Ionenkanone (focused ion beam, FIB) ausgestattet, die in einem Winkel von 50-90 Grad zum Elektronenstrahl justiert ist. Statt des Diamantmessers bei SBEM wird hier also ein Ionenstrahl genutzt, um die oberste Gewebeschicht nach Bildgebung abzdampfen. Vorteil ist die erheblich höhere Auflösung in Schneiderichtung (insgesamt bis zu 5 nm x 5 nm x 5 nm, (Knott, Marchman et al. 2008)). Bisher ist diese Technik allerdings auf Volumina bis zu ca. 50 μm x 50 μm x 50 μm beschränkt.

Datenrekonstruktion

Für die Vermessung von Nervenzellnetzwerken ist die Bildaufnahme nur der erste Schritt. Die beschriebenen Volumen-EM-Techniken liefern Bildvolumina, welche nur den Elektronen-Streukontrast repräsentieren (je nach Färbemethode wurden Bilipid-Membranen und Proteinaggregate mit Schwermetallverbindungen angereichert). In einem nächsten Schritt muss

also aus dem Grauwert-Bildvolumen eine Volumensegmentierung berechnet werden, welche für jeden Ort im Bildvolumen die Identität der Nerven- oder Gliazelle kodiert, zu der dieser Ort gehört (zudem enthalten die Volumina natürlich Blutgefäße, Endothel und Extrazellulärraum).

Die Analyse von EM-Bilddaten wurde schon immer manuell ausgeführt. Konventionell wurden die Plasmamembranen der Nervenzellfortsätze nachgezeichnet und daraus sukzessive Nervenzellvolumina rekonstruiert. Diese Rekonstruktion ist jedoch so langsam, dass auch kleinere Nervenzellnetzwerke Hunderttausende bis Millionen Arbeitsstunden verschlingen würden.

Daher war ein wichtiger Fortschritt zur schnelleren Rekonstruktion die Entwicklung effizienter Software, die manuelle Annotation erleichtert. Inzwischen gibt es hier für die verschiedenen EM-Bilddaten mehrere Anwendungen, die eine Google-Maps-artige Dateninteraktion mit Volumen- oder Skelettannotation verbinden (catmaid/openconnectome.org, Fiji/TrakEM2, KNOSSOS, s. (Helmstaedter und Mitra 2012) für eine Überblicksdarstellung). Diese Entwicklungen erreichten eine bis zu 50-fache Steigerung der Rekonstruktionseffizienz (Helmstaedter, Briggman et al. 2011).

Bei der Analyse manueller Annotationsergebnisse für die dichte Netzwerkrekonstruktion zeigte sich jedoch ein unerwartetes Problem: Selbst Experten irren, insbesondere werden Abzweigungen von Axonen übersehen. Offensichtlich stellt sich hier ein besonderes Problem der Dendritdichte: Während bei lichtmikroskopischen Daten die oft spezifisch gefärbten einzelnen

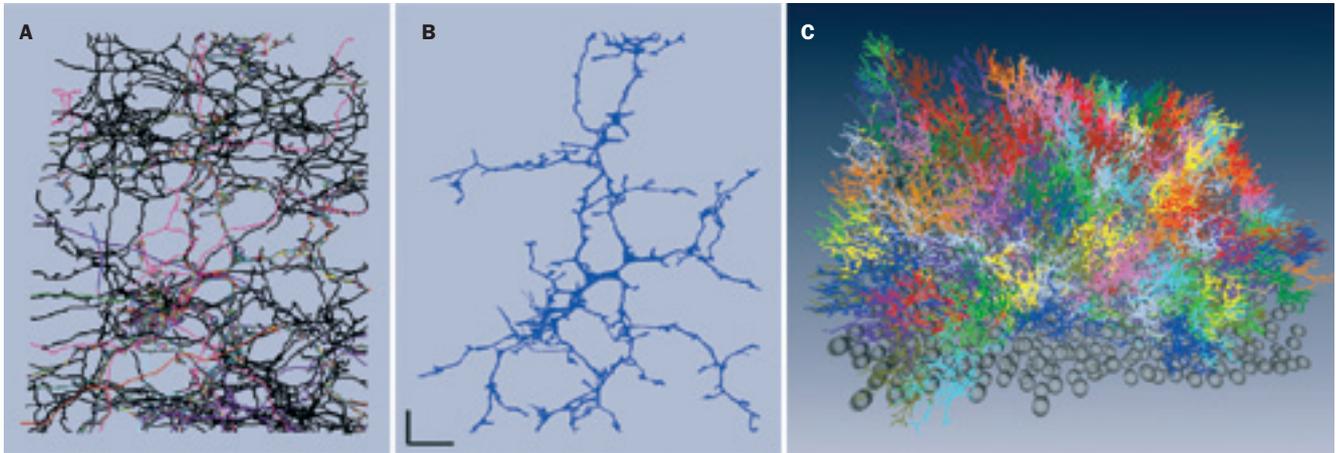


Abb. 2: Ergebnisse der Massenrekonstruktionen. A), B) Mehrfache Rekonstruktion einer Amakrinzelle in der Mausretina durch 50 Studenten (A), und Ergebnis der algorithmischen Konsensfindung für die selbe Zelle (B). C) Cross-validierte Rekonstruktion von 114 Stäbchen-Bipolarzellen in der Mausretina, entsprechend rund 1000 Arbeitsstunden. Nach (Helmstaedter, Briggman et al. 2011).

Nervenzellen mit geringen Fehlerraten rekonstruierbar sind, muss bei der dichten Rekonstruktion ständig (typischerweise nach 1-2 Mikrometern Pfadlänge) die Entscheidung getroffen werden, ob ein Fortsatz verzweigt, oder ob die vielen anderen sichtbaren Neuriten zu anderen Nervenzellen gehören. Eine solche Situation ist für manuelle Annotation besonders herausfordernd, da die Methodik hier an die Grenzen der konstanten menschlichen Aufmerksamkeit stößt. Es zeigte sich, dass die „Fehler“ der Experten zum größten Teil nicht an besonders schwierigen Datenpunkten, sondern an im Nachhinein offensichtlichen Stellen geschahen.

Das Problem der Fehlerkorrektur stellt sich bisher in allen Kombinationen aus Daten und Annotationssoftware, und es werden verschiedene Lösungsstrategien verfolgt. Typischerweise werden die Rekonstruktionen durch Korrekturlesen verbessert. Ein anderer Ansatz verzichtet auf die visuelle Überprüfung bereits erfolgter Rekonstruktionen, stattdessen rekonstruieren mehrere Annotatoren unabhängig voneinander die selbe Nervenzelle, und die gesammelten Annotationen werden dann algorithmisch zu einem optimalen Konsens zusammengefügt (RESCOP, (Helmstaedter, Briggman et al. 2011), Abbildung 2 A, B).

Natürlich werden für die Datenrekonstruktion auch direkt automatische Bildverarbeitungsansätze verfolgt. Es zeigte sich jedoch bald, dass die Volumen-EM-Daten des Nervengewebes besonders schwierig zu rekonstruieren sind. Automatische Algorithmen sind bis heute mehrere Größenordnungen fehleranfälliger als menschliche Annotatoren. Das Problem

ist vermutlich die hochkorrelierte Analyse: Jeder Rekonstruktionsfehler entlang eines Axons zwischen Synapse und Zellkörper verhindert die korrekte Zuordnung dieser Synapse. Die tolerierbaren Fehlerraten sind also extrem klein, weit jenseits der aktuell bei automatischer Bildsegmentierung

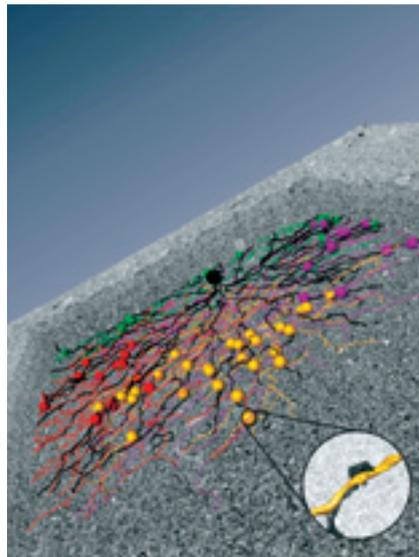


Abb. 3: Gezielte Schaltkreiskonstruktion des Richtungsselektivitäts-Schaltkreises in der Maus-Retina als Beispiel erster Connectomics-Ergebnisse. Eine starburst amacrine cell sowie die synaptischen Kontakte zu funktionell charakterisierten direction selective ganglion cells sind dargestellt. Das gesamte Datenvolumen war ca. 300 μm x 300 μm x 80 μm groß, in diesem wurden rund 30 Nervenzellen gezielt rekonstruiert. Vergrößert ist ein synaptischer Kontakt gezeigt. Nach Briggman, Helmstaedter et al. 2011.

erreichbaren. Daher verfolgen die heute verwendeten Rekonstruktionsansätze zu meist eine Kombination aus langreichweiger manueller und lokaler automatischer Analyse.

Um die massiven Bilddaten erfolgreich zu rekonstruieren, muss also eine große Zahl von Annotatoren zum Einsatz kommen. Für die Rekonstruktion von Schaltkreisen in der Retina sind mehr als zweihundert Studenten in Heidelberg und München tätig (Abbildung 2C). Diese Methoden skalieren offensichtlich nicht beliebig, und um weitere substanzielle Rekonstruktionserfolge zu erzielen, müssen deutlich effizientere Methoden verfolgt werden. Zu den aktuell entwickelten Ansätzen zählt dabei das online crowd sourcing, also der Versuch, die interessierte Öffentlichkeit online an der Datenanalyse zu beteiligen. Ein erster Versuch mit in Heidelberg gewonnenen Retina-Daten ist unter www.eyewire.org bereits öffentlich zugänglich (Seung, MIT), weitere solcher Ansätze sind in Entwicklung (z.B. www.brainflight.org, Max-Planck-Institut München).

Erste Erfolge der Connectomics

Die wesentlichen Herausforderungen der *Connectomics* sind, wie beschrieben, zunächst methodischer Natur. Es konnten aber bereits erste Beispiele für die Erkenntniskraft der Schaltkreisanalysen erbracht werden. In einer Studie zur synaptischen Verschaltung der Richtungsdetektion in der Mausretina wurden funktionelle Messungen mit SBEM kombiniert und die hochselektive Verschaltung der inhibitorischen richtungsselektiven Zellen (starburst amacrine cells) mit den dann ebenfalls rich-

tungsselektiven Ganglionzellen (direction selective ganglion cells) bewiesen (Briggman, Helmstaedter et al. 2011), siehe auch den Übersichtsartikel von Euler und Hauselt in Neuroforum 2012). In einer zweiten Studie wurde 2-Photonenmikroskopie mit serieller TEMCA-Mikroskopie kombiniert, um die Spezifität inhibitorischer Verschaltungen im visuellen Kortex zu untersuchen (Bock, Lee et al. 2011).

Interessanterweise stellen beide Studien Beispiele dar, wie die Kombination aus funktioneller Nervenzell-Charakterisierung und Volumenelektronenmikroskopie die nachfolgende Schaltkreisanalyse informiert und damit eine gezielte Netzwerkrekonstruktion erlaubt. Im Fall der Retina wurden lediglich rund dreißig Nervenzellen (von Tausenden, die in dem Volumen enthalten waren, Abbildung 3) rekonstruiert. Tatsächlich *dichte* Netzwerk-Rekonstruktionen werden aktuell für die Mausretina und weitere Systeme durchgeführt.

Ausblick

Die neuen Methoden der *Connectomics* liefern wichtige Informationen über die Struktur von Nervenzellverschaltungen. Diese Daten sind notwendig, um zu kompletterem Verständnis der Rechenkapazität von Nervenzellschaltkreisen zu kommen. Sie sind natürlich nicht hinreichend, nur in Kombination mit funktionellen Daten und in wohldefinierten Verhaltensparadigmen werden sie zu wesentlichen neuen Erkenntnissen über die Verrechnungseigenschaften neuronaler Systeme beitragen. Erhebliche

methodische Herausforderungen stellen sich noch für die Datenrekonstruktion. Dennoch scheint die Hoffnung berechtigt, dass Techniken der *Connectomics* in den nächsten Jahren ebenso selbstverständlich das methodische Repertoire vieler neurowissenschaftlicher Labore ergänzen können wie es andere Mikroskopietechniken heute bereits leisten.

Literatur

- Bock, D.D., Lee, W.C. et al. (2011): Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature* 471 (7337): 177-182.
- Briggman, K.L. und Bock, D.D. (2012): Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. *Current opinion in neurobiology* 22 (1): 154-161.
- Briggman, K.L., Helmstaedter, M. et al. (2011): Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature* 471 (7337): 183-188.
- Denk, W. und Horstmann, H. (2004): Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol* (11): e329.
- Hayworth, K.J., Kasthuri, N. et al. (2006): Automating the Collection of Ultrathin Serial Sections for Large Volume TEM Reconstructions. *Microsc Microanal* 12 (Supp2): 86-87.
- Helmstaedter, M., Briggman, K.L. et al. (2008): 3D structural imaging of the brain with photons and electrons. *Curr Opin Neurobiol* 18 (6): 633-641.
- Helmstaedter, M., Briggman, K.L. et al. (2011): High-accuracy neurite reconstruction for high-throughput neuroanatomy. *Nature neuroscience* 14 (8): 1081-1088.
- Helmstaedter, M. und Mitra, P.P. (2012): Computational methods and challenges for

large-scale circuit mapping. *Current opinion in neurobiology* 22 (1): 162-169.

Knott, G., Marchman, H. et al. (2008): Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci* 28 (12): 2959-2964.

White, J.G., Southgate, E. et al. (1986): The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B BiolSci* 314: 1-340.

Kurzbiografie

Dr. med. Dipl. Phys. Moritz Helmstaedter, geboren 1978 in Berlin, ab 1998 Studium der Medizin und Physik an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Promotion bei Prof. Dr. Bert Sakmann am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, 2006-2011 ebendort wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. Winfried Denk, seit 2011 Forschungsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried.

Korrespondenzadresse

Dr. Moritz Helmstaedter
 Forschungsgruppe Struktur Neokortikaler Schaltkreise
 Max-Planck-Institut für Neurobiologie
 Am Klopferspitz 18
 82152 Martinsried
 Tel.: +49 89 85783690
 E-Mail: mhelmstaedter@neuro.mpg.de

© Springer-Verlag GmbH 2013

Einladung zur Mitgliederversammlung auf der 10. Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft (13. – 17. März 2013)

Termin: Donnerstag, 14. März 2013, 12.00 – 13.00 Uhr

Vorläufige Tagesordnung:

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1. Begrüßung durch den Präsidenten | 5. Bericht zur Göttinger Tagung |
| 2. Bestätigung des Protokolls der letzten Mitgliederversammlung | 6. Wahl des neuen Vorstandes |
| 3. Bericht des Schatzmeisters | 7. Aktivitäten der Gesellschaft |
| 4. Mitteilungen | 8. Verschiedenes |



Vorschläge für weitere Tagesordnungspunkte reichen Sie bitte bis spätestens **15. Februar 2013** bei der Geschäftsstelle ein.

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V.
 Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)
 Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin
 E-Mail: gibson@mdc-berlin.de