

# **Modulation of spontaneous and electrically evoked activity of cortical networks by GABA<sub>A</sub>ergic synaptic transmission during the development *in vitro***

Dipl.-Neurowiss. Thomas Baltz

Oscillatory synchronized events are ubiquitous in the developing nervous system, including the cerebral cortex *in vivo*, cortical slices and in-vitro preparations. Networks formed by embryonic dissociated cortical neurons grown on arrays of microelectrodes are a widely used model system, which allows measurements of the electrical activity and electrical stimulation over extended periods of time. The present thesis represents a comprehensive study of the network activity and its relation to GABA<sub>A</sub> receptor mediated synaptic transmission of embryonic (E16) cortical networks during their in-vitro development using multi-site extracellular electrophysiological recordings, electrical stimulation, functional multi-neuron calcium imaging, computational models and immunocytochemistry.

In the first part of this thesis, the emergence of the oscillatory activity was studied in three computational models. The modeled networks consisted of leaky integrate-and-fire neurons, which were driven by either neurons that were intrinsically bursting, intrinsically random spiking or driven by spontaneous synaptic activity. The data indicate that model networks driven by intrinsically bursting cells show a good approximation of the emergent recurrent population activity in young networks, whereas the activity of older networks seems to be better explained by spontaneous synaptic activity.

In the second part, the relation of developmental changes of the GABAergic system to the spontaneous network activity was studied. All cultures investigated displayed stereotyped synchronized burst events at the end of the first week *in vitro*. With ongoing development, the stereotyped burst activity changed to a more clustered and asynchronous activity pattern. This change did not occur in cultures cultivated with blocked GABA<sub>A</sub> receptors or in cultures with a reduced amount of large, mostly parvalbumin positive GABAergic neurons. Pharmacological experiments indicate that the gradual change of the mode of GABA action from depolarizing to hyperpolarizing ('GABA shift') accounts for the change of activity to more elaborated patterns. Moreover, the present data indicate that the occurrence of the GABA shift does not critically depend on GABA<sub>A</sub> receptor-mediated synaptic transmission provided by large GABAergic cells. It is suggested that the richly interconnected large GABAergic neurons contribute to desynchronize and temporally differentiate the spontaneous activity of cultured cortical networks.

Cortical neurons grown on microelectrode arrays represent prototypic networks in which responses to electrical stimulation can be studied extensively to gain general insights in the input-output relationships of neuronal structures. In the final part of the thesis, the relation of the spontaneous network activity to short electrical pulses was investigated by a variety of stimulation paradigms throughout the in-vitro development. The data indicate that the electrically evoked activity of cortical networks *in vitro* is governed by at least two, potentially mutually interacting mechanisms. First, a refractory period in the order of a few seconds and, secondly, a very slow GABA dependent oscillation (~0.004 Hz) of the network excitability.

# Modulation of spontaneous and electrically evoked activity of cortical networks by GABA<sub>A</sub>ergic synaptic transmission during the development *in vitro*

Dipl.-Neurowiss. Thomas Baltz

Periodische synchrone Aktivität ist ein kennzeichnendes Merkmal sich entwickelnder neuronaler Netzwerke und wird als essentiell für die Reifung neuronaler Strukturen angesehen. Während der Entwicklung des Neokortex tritt diese Aktivitätsform zusammen mit der noch stark depolarisierenden Wirkung des Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) auf. GABA ist der wichtigste inhibitorisch wirkende Neurotransmitter des adulten Säugerhirns, unterstützt jedoch während einer transienten Phase der frühen neokortikalen Entwicklung die Generierung von Aktionspotenzialen. Beeinträchtigungen bei der Entwicklung GABAerger Mechanismen sind mit pathologischen Zuständen wie Autismus, mentaler Retardierung, Schizophrenie und Epilepsie assoziiert. In vorangegangenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der aufkommenden inhibitorischen Wirkung von GABA ('GABA shift') und des sukzessiven Abklingens der frühen synchronen Netzwerkaktivität vorgeschlagen.

Auf Mikroelektrodenarrays gezüchtete dissoziierte kortikale Zellkulturen stellen ein weit verbreitetes Modellsystem dar, das es erlaubt die elektrische Aktivität vieler Neurone über einen langen Zeitraum hinweg simultan zu messen. Die vorliegende Arbeit stellt eine umfassende Studie der elektrischen Aktivität embryonaler (E16) kortikaler Zellkulturen während der *in-vitro* Entwicklung, sowie des Einflusses GABA<sub>A</sub> Rezeptor vermittelter synaptischer Neurotransmission darauf, dar. Methodisch stehen dabei extrazelluläre Mehrkanalaufnahmen, elektrische Stimulation, funktionales Calcium-Imaging, Rechner gestützte Simulationen und immunzytochemische Verfahren im Vordergrund.

Die synchrone Aktivität unreifer neuronaler Netzwerke kann durch mehrere, sich nicht notwendigerweise gegenseitig ausschließende, Mechanismen angetrieben werden. Jeder dieser Mechanismen hat prinzipiell distinkte Implikationen auf die Phänomenologie, die Entstehung oder die Erhaltung der synchronen Aktivität. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst die Entstehung der synchronen Aktivität in drei, rein exzitatorischen, Netzwerkmodellen untersucht und mit extrazellulären Mehrkanalaufnahmen unreifer kortikaler *in-vitro* Netzwerke verglichen. Die Modellnetzwerke bestanden dabei aus Neuronen des Integrate-and-Fire Typs, die entweder durch spezielle Taktgeberneurone, randomisiert feuernde Neurone oder durch spontane synaptische Aktivität getrieben wurden. Die resultierenden Ergebnisse legen nahe, dass durch Taktgeberneurone getriebene Modellnetzwerke eine gute Approximation der aufkommenden synchronen Aktivität in einem sehr frühen Entwicklungsstadium darstellen, während spontane synaptische glutamaterge Neurotransmission während der weiteren Entwicklung an Bedeutung zu gewinnen scheint.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen der Wirkungsweise von GABA und der spontanen elektrischen Aktivität untersucht. Nach der ersten Woche *in vitro* war die Netzwerkaktivität in allen untersuchten Kulturen durch rekurrente, stereotype synchrone Aktivität gekennzeichnet. Mit der Abnahme der depolarisierenden Wirkung von GABA änderte sich die Netzwerkaktivität von stereotyper synchroner Aktivität hin zu heterogener und weniger synchroner Aktivität. Das Auftreten des GABA shifts war nicht kritisch von synaptischer Transmission großer (Somafläche >100 $\mu\text{m}^2$ ), oft Parvalbumin positiver GABAerger Zellen abhängig. In Kulturen mit einer dauerhaften pharmakologischen Unterdrückung GABA<sub>A</sub> Rezeptor vermittelter Neurotransmission, sowie in Kulturen mit einem reduzierten Gehalt großer GABAerger Neurone, blieb die stereotype Aktivität erhalten. Basierend auf diesen Ergebnissen wird vorgeschlagen, dass die großen GABAergen Neurone in kultivierten kortikalen Netzwerken zur Desynchronisation und Differenzierung der spontanen Netzwerkaktivität beitragen. Des Weiteren legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass aus dem dorsalen Bereich des embryonalen Neokortex gewonnene Zellkulturen künftig bei Fragestellungen, in denen überwiegend exzitatorische Neurotransmission im Vordergrund steht, als geeignetes Modell dienen können.

Kortikale Zellkulturen die auf Mikroelektrodenarrays kultiviert wurden stellen prototypische Netzwerke dar, mit deren Hilfe generelle Antworteigenschaften neuronaler Strukturen auf elektrische Reizung umfassend untersucht werden können. Bislang wurde extrazelluläre elektrische Stimulation *in vitro* häufig dazu genutzt neurowissenschaftliche Phänomene wie Adaptation, Lernen und Plastizität zu untersuchen. Des Weiteren wurde, als potenzielle Behandlungsmöglichkeit für Epilepsie, experimentell versucht die synchrone Netzwerkaktivität *in vitro* mit Hilfe elektrischer Pulse zu unterdrücken. Vermutlich teilweise aufgrund des fehlenden externen (d.h. des sensorischen) Inputs, behalten kortikale in-vitro Netzwerke eine (teil-)synchrone Aktivität während des gesamten Kultivierungszeitraumes bei, bis hin zu zwei Jahren *in vitro*. Im letzten Teil dieser Arbeit wurden daher generelle Antworteigenschaften, sowie das Zusammenspiel von spontaner synchroner Netzwerkaktivität und elektrischer Reizung untersucht. Dazu wurden die Kulturen während der ersten drei Wochen *in vitro* mit einer Vielzahl von Stimulationsparadigmen elektrisch gereizt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Beitrag GABA<sub>A</sub> Rezeptor vermittelter synaptischer Neurotransmission gelegt. In Kulturen mit intakter und chronisch blockierter GABA<sub>A</sub>erger Neurotransmission führte niederfrequente Reizung zu einer maximalen Antwortstärke. Dies weist auf eine netzwerkweite Refraktärzeit hin. In Doppelpuls-Experimenten wurde in drei Wochen alten Kulturen mit intakter GABA<sub>A</sub>erger Neurotransmission bereits nach ca. 10-100 ms eine graduelle Rückgewinnung der Netzwerkerregbarkeit beobachtet. Im Gegensatz dazu, kehrte die Netzwerkerregbarkeit in Kulturen mit chronisch blockierten GABA<sub>A</sub> Rezeptoren erst nach mehr als 2 Sekunden zurück. Des Weiteren änderte sich die Netzwerkerregbarkeit in Kulturen mit intakter GABA<sub>A</sub>erger Neurotransmission, nicht jedoch die in Kulturen mit blockierter GABA<sub>A</sub>erger Neurotransmission periodisch, mit einer sehr langsamen spontanen Fluktuation (ca. 0.004 Hz) der Gesamtaktivität. Die Reaktion auf elektrische Reizung kortikaler in-vitro Netzwerke hängt daher von mindestens zwei, sich möglicherweise gegenseitig beeinflussender, Mechanismen ab. Zum einen von einer Refraktärzeit in der Größenordnung von wenigen Sekunden; zum anderen von einer langsamen spontan auftretenden GABA abhängigen periodischen Änderung der Netzwerkaktivität. In künftigen in-vitro Studien, bei denen plastische Änderungen, ausgelöst durch extrazelluläre elektrische Stimulation, im Vordergrund stehen, sollten daher beide Mechanismen berücksichtigt werden, um den Grad der durch die Stimulation ausgelösten plastischen Änderungen besser einschätzen zu können.